

中华人民共和国国家标准

《饲料中维生素 A 的测定 高效液相色谱法》

编制说明

(公开征求意见稿)

中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所

2023 年 9 月 22 日

目 录

一、工作简况，包括任务来源、制定背景、工作过程等.....	2
（一）任务来源.....	2
（二）修订背景.....	2
（三）主要工作过程.....	3
二、标准编制原则、主要内容及其确定依据.....	5
（一）标准编制原则.....	5
（二）技术内容及其确定的依据.....	6
三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果.....	9
（一）固相萃取方法验证.....	9
（二）在线固相萃取法验证.....	18
（三）直提法方法验证.....	25
（四）小结.....	40
四、与国际、国外同类标准技术内容、有关数据对比情况.....	41
五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准.....	42
六、与有关法律、法规的关系.....	42
七、重大分歧意见的处理经过和依据.....	42
八、涉及专利的有关说明.....	42
九、贯彻标准的要求和措施建议.....	42
十、其他应当说明的事项.....	42

一、工作简况，包括任务来源、制定背景、工作过程等

（一）任务来源

根据《国家标准化管理委员会关于下达 2020 年第三批推荐性国家标准计划的通知》（国标委发 [2020] 48 号），“饲料中维生素 A 的测定 高效液相色谱法”（GB/T 17817—2010）标准修订项目计划编号 20203891-T-469，起草单位为中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所[国家饲料质量检验检测中心（北京）]、山东省饲料质量检验所、帝斯曼维生素（上海）有限公司、四川威尔检测技术股份有限公司、中牧实业股份有限公司、广州爱保农生物科技有限公司。本标准由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）提出并归口。

（二）修订背景

维生素是具有高度生物学活性的有机化合物，是维持动物正常生命和生长所必需的一类特殊的营养物质。维生素 A 有天然和人工合成两类。天然的维生素 A 只存在于动物性食物中，主要存在于肝脏中，植物组织中尚未发现，人工合成的主要有维生素 A 乙酸酯、维生素 A 棕榈酸酯。用作饲料添加剂的主要以合成维生素 A 产品为主。

维生素 A 不溶于水而溶于油脂和乙醇等脂溶性溶剂。分子中含多个不饱和键，化学性质活泼，对空气、热、湿度和光敏感，在光和空气中易被氧化而失去生理效能，为了增加维生素 A 的稳定性，维生素 A 除脂化、添加抗氧化剂外，目前常用的方法还有用稳定的物质明胶、淀粉进行包被。

维生素 A 在维护动物视觉、维护黏膜的完整性、促进生长和生殖、影响造血机能、抗氧化、抑制肿瘤、维持正常的免疫功能等方面都起着极其重要的作用，是各种养殖动物必需添加的微量营养成分，因此添加剂预混合饲料中维生

素 A 乙酸酯也常被列为国家监督抽查必检项目。

现行国标 GB/T 17817—2010 已颁布实施十几年，原标准方法中皂化法检测步骤多，时间长，多年来，制标单位一直致力于研发快速准确的检测方法，固相萃取、在线固相萃取-二维液相色谱法与原皂化法比较，可节省大量化学试剂，缩短检测时间，能够满足检测方法允许误差要求。2020 年 5 月，我们申请修订该项标准，新的检测技术的应用可以提高实验室工作效率，为饲料质量安全监管提供科学依据。

（三）主要工作过程

接到修订任务后，成立了赵小阳、宋荣、虞哲高、张凤枰、刘向阳、朱高群、刘志英、郭红双、汪忠艳、李俊玲、谢丽、李丽蓓、张辉、宋艳、冯秀燕、曹林等成员的标准起草小组。2021 年 5 月，主持单位在北京组织起草单位，科研院所技术人员召开标准修订启动会，中牧实业股份有限公司、广州爱保农生物科技有限公司、山东省饲料质量检验所、安捷伦科技公司介绍了本单位工作基础及科研进展，四川威尔检测技术股份有限公司汇报了国内外相关标准和文献进展；会上详细研讨修订路线，在广泛调查研究、讨论和实验室以往试验工作的基础上，拟修订内容如下：

a) 皂化提取法范围增加了精料补充料，直接提取法范围增加复合预混合饲料。直接提取法更改了定量限（见第 1 章，2010 年版的第 1 章）；

b) 皂化提取法提取剂更改为石油醚（沸程 30 °C-60 °C）（见第 4 章，2010 年版第 3 章）；

c) 第一法中增加了维生素 A 标准系列溶液（见 4.2.19）

d) 第一法中配合饲料、精料补充料、浓缩饲料样品制备方法更改为试样全

部通过 1 mm 孔筛（见 4.4，2010 年版中 3.5）；

e) 增加了离线固相萃取法（4.5.1.2.2）和在线固相萃取法（4.5.1.2.3）及其色谱图；

f) 增加了液相色谱参考条件（见 4.5.2.2 和 4.5.2.3）；

g) 增加了定性检测方法，定量检测增加多点校正（见第 4 章）；

h) 更改了第一法中试验数据处理（见 4.6，2010 年版的 3.6.2.3）；

i) 删除了正相色谱条件（2010 年版第 3 章）；

j) 更改了直接提取法提取温度，由 65 °C 改为室温（见第 5 章，2010 年版第 4 章）；

k) 增加了直接提取法中维生素 A 标准系列溶液（见 5.2.4）

l) 更改了直接提取法中试验数据处理（见 5.6，）

m) 增加校正维生素 A 及维生素 A 乙酸酯标准储备溶液浓度的方法（见附录 A）。

按照会议要求，主持单位收集有代表性样品，包括配合饲料、精料补充料、浓缩饲料、复合预混合饲料、维生素预混合饲料约 60 余批次，中牧实业股份有限公司与广州爱保农生物科技有限公司负责制备试验用添加回收率样品。

2022 年 11 月 3 日，以线上会议方式（腾讯会议，会议号 168 990 278）：召开国标《饲料中维生素 A 的测定 高效液相色谱法》标准修订讨论会，参加实验验证工作单位、生产使用企业 14 名技术人员参加会议，对标准草案、修订提出了意见和建议。

2022 年 11 月~2023 年 5 月，进一步补充试验，开展标准验证，形成标准文本和编制说明征求意见稿。

2023年6月，由四川威尔检测技术股份有限公司承担征求意见稿及编制说明定向征求意见，发函单位30个，回函单位21个，未回函单位9个，提出意见单位21个，无意见单位0个，共提出意见170条，采纳109条，部分采纳或未采纳61条。

2023年9月22日，起草单位组织专家对该标准进行预审，专家组由常碧影、柏凡、张若寒、任玉琴、吴宁鹏、商军、吴银良、杨金枢组成。专家组提出如下修改意见：

1) 根据编制说明中试验数据进一步确认第二法定量限。

2) 编制说明中补充第一法中固相萃取柱优化过程的试验数据，以及不同品牌固相萃取柱的试验数据。

3) 编制说明中补充第一法中固相萃取净化的低含量添加回收试验数据。

4) 编制说明中补充第二法中不测维生素A棕榈酸酯理由。

5) 按照GB/T 1.1—2020、GB/T 20001.4—2015的要求规范标准文本。

与会专家一致同意标准起草单位按照上述意见修改形成公开征求意见稿，报全国饲料工业标准化技术委员会秘书处。

会后，起草组根据预审专家意见，补充修改预审稿及预审稿编制说明，形成公开征求意见稿。

二、标准编制原则、主要内容及其确定依据

(一) 标准编制原则

现行ISO、AOAC方法中，待测样品前处理采用氢氧化钾乙醇溶液皂化，石油醚提取，净化、浓缩后，采用高效液相色谱方法检测。见表1。

表 1 国际标准方法

序号	标准号	标准名称
1	ISO 14565:2000	Animal feeding stuffs—Determination of vitamin A content — Method using high-performance liquid chromatography
2	AOAC Official Method 2001.13	Determination of Vitamin A (Retinol) in Foods Liquid Chromatography (First Action 2001)
3	ISO 12080-2:2009	Dried skimmed milk — Determination of vitamin A content — Part 2: Method using high-performance liquid chromatography
4	2009R0152-EN-12.02.2013-002 .002-65	Methods of analysis to control the level of authorised additives in feed, Determination of vitamin A;

国内相关标准见表2，在食品安全国家标准GB 5009.82—2016中，规定不同基质样品的检测方法，第一法适用于食品中维生素 A 和维生素 E的测定，试样中的维生素A及维生素E经皂化、液液萃取或固相萃取、净化、浓缩后C30或PFP反相液相色谱柱分离，紫外检测器或荧光检测器检测，外标法定量。现行国标饲料中维生素A的测定包括两种方法，皂化法和直提法，高效液相色谱测定，其中第一法液液萃取与ISO、AOAC、食品安全国家标准方法原理相同。

表 2 国内标准方法

序号	标准号	标准名称
1	GB/T 17817-2010	饲料中维生素 A 的测定 高效液相色谱法
2	GB 5009.82-2016	食品中维生素 A、D、E 的测定
3	GB 14750-2010	食品安全国家标准 食品添加剂维生素 A
4	GB 1903.31-2018	食品安全国家标准 食品营养强化剂醋酸视黄酯 (醋酸维生素 A)

(二) 技术内容及其确定的依据

在农业农村部2625号公告“饲料添加剂安全使用规范”中，规定了猪、鸡、牛、羊、鱼类配合饲料或全混合日粮中维生素A推荐添加量和最高限量，本标准在第一法范围中，补充精料补充料，在第二法中，补充复合预混合饲料中维生素A乙酸酯的检测方法，由于维生素A棕榈酸酯成本高，与维生素A乙酸酯产品相比，在应用上也没有特别的优势，基于我国饲料行业所用的维生素A产品都是合成的

维生素A乙酸酯，在本标准的直接提取法中，只适用于维生素A乙酸酯产品，未将维生素A棕榈酸酯产品考虑进去。

在新修订国标《动物饲料 试样制备》中，规定不稳定分析物用试样的推荐粒度为1.0 mm，预混剂中维生素试样不粉碎，本文件将“4.4 样品”修改为配合饲料、精料补充料、浓缩饲料试样，按照GB/T 20195规定制备试样，至少200 g，粉碎使其全部通过1 mm孔径的试验筛，混合均匀，装入密闭容器中，避光冷藏保存，尽快测定。复合预混合饲料试样、维生素预混合饲料试样装入密闭容器中，避光冷藏保存，尽快测定。

在ISO方法中，液液萃取溶剂采用石油醚提取两次，每次用125 mL石油醚，原标准方法中萃取溶剂用乙醚提取，乙醚是易燃、有毒类危险品，属于管制化学品，因此修改提取溶剂为石油醚（30-60°C），已方便实验室使用。

原标准中皂化法中有机溶剂使用量大，前处理时间长，目前，固相萃取方法在样品前处理过程中已普遍使用，该方法采用选择性吸附、选择性洗脱的方式对样品进行富集、分离、净化，使样品提取过程更为简便，检测结果重现性好，并能降低有机溶剂使用量，减少化学试剂污染，同时可提高实验室工作效率，因此标准修订补充了固相萃取方法。

检测方法补充了在线固相萃取方法，样品经乙醇碱溶液皂化后，经在线固相萃取柱富集、分离、净化，高效液相色谱测定，该方法优势是皂化液直接上样，人工操作由仪器完成，降低了检测误差，提高了工作效率。

删除正相色谱条件，饲料添加剂维生素A乙酸酯原料标准中规定，试样溶液中维生素A的峰面积以反式和顺式异构体的面积之和计算含量，因此维生素A的含量是以反式和顺式的总量计的。在GB/T 17817-2010中，皂化法中给出了反相

色谱和正相色谱二种色谱条件。在反相色谱中，维生素A的顺反异构体在同一时间出峰，计算得到的维生素A为顺反式异构体的总量，与原料标准中维生素A的表述结果一致，具有合理性。而在正相色谱中，顺式维生素A和反式维生素A的出峰时间不一样，在结果计算中，给出的维生素A为反式维生素A的含量。由于正相色谱能将顺、反式维生素A乙酸酯分开，结果按照反式维生素A乙酸酯计算；反相色谱无法将顺、反式维生素A分开，结果是按照顺、反式维生素A之和计算，考虑到正相色谱法和反相色谱法得到的维生素A的结果表达不一致；在操作上正相色谱不易达到平衡，所用流动相的毒性较大；再加上样品经皂化提取后，维生素A在反相色谱上与其他干扰物质的分离没有问题，在维生素A的标准中，没必要放入正相和反相二种不同分离模式的色谱条件，在这次标准的修订中，删除皂化法中正相色谱条件。

通常维生素A的单位是以国际单位每千克表示，GB/T 17817-2010表1中相对偏差所规定的单位是毫克每千克，与上一版本GB/T 17817-1999中相对偏差规定的单位国际单位每千克有差异，规定的范围及对应的允许偏差要求完全一致。本次修订相对偏差的数值规定不变，维生素A的单位调整为国际单位每千克。

饲料中维生素A乙酸酯采用的是明胶包被，各生产企业胶联技术不同，原标准中第二法规定超声提取温度为65℃，发现主峰后面会分解出小峰，小峰在色谱上可以得到分离，如果产生的小峰峰面积很小，对含量影响不大，改为室温超声提取，样品处理好后尽快上机测试，可减少目标物损失，更好满足回收率要求。标准贮备溶液临用前需校正，标准工作溶液现用现配。根据方法定量限，补充添加剂复合预混合饲料的检测方法。

参照食品安全国家标准GB 5009.82—2016中附录B，维生素A标准溶液校正方法，见文件中附录A中规定的方法。

三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

（一）固相萃取方法验证

1. 不同品牌固相萃取柱的选择

根据维生素 A 的性质特点，应选择吸附特性为非极性的净化小柱。用碱溶液皂化试样后，经固相萃取柱富集、分离、净化、浓缩后，残渣溶于适当溶剂，注入 HPLC 分离，在波长 325 nm 条件下测定，外标法计算维生素 A 含量。

由于需要通过固相萃取技术实现 VA（希望能够兼顾 VD3 和 VE）的富集，同时需要去除皂化液中的强碱以保护分析色谱柱，因此固相萃取柱均选择商品化聚合物反相填料表面亲水能力强的类型，如果选择聚苯乙烯-二乙烯基苯-吡咯烷酮聚合物填料的类型，亲水基团键合在填料内部，疏水性物质的保留能力就弱了。实验中比较了安捷伦 Bond Elut HLB（200mg，6mL），Bond Elut Plexa（200mg，6mL），Thermo PEP（200mg，6mL），Waters Oasis HLB（200mg，6mL）和纳谱 PSS（200mg，6mL）等 5 种不同品牌的聚合物反相固相萃取 SPE 柱，其中 Oasis HLB 和 Bond Elut HLB 均为二乙烯苯和 N-乙烯基吡咯烷酮共聚物反相吸附材料，而 Bond Elut Plexa、PEP 和 PSS 均为聚苯乙烯和二乙烯基苯聚合物填料。取 6mL 均匀分散的皂化液，分别加入等量 VA 视黄醇、VD3 和 VE 生育酚的标准样品，混合均匀后过柱，经 10mL 水淋洗后，5mL 乙腈洗脱。综合考虑维生素 A、D₃、E 的回收率结果，Agilent Bond Elut Plexa 和 Thermo PEP 固相萃取柱回收率满足方法要求，见图 1，针对 VA，每种色谱柱均可达到满意

的回收率结果，见图 2。

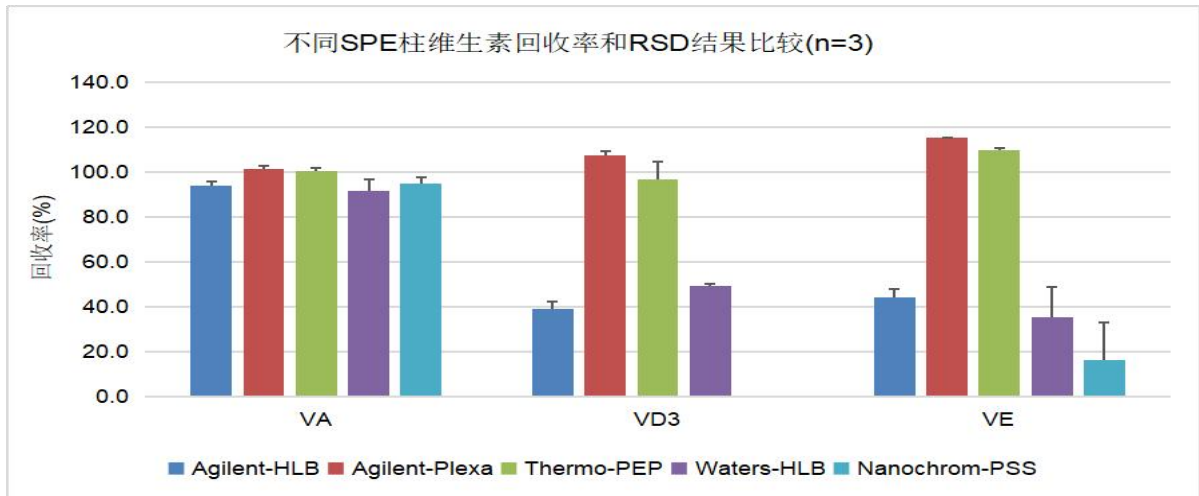


图 1 不同 SPE 柱维生素回收率和 RSD 结果比较 (n=3)

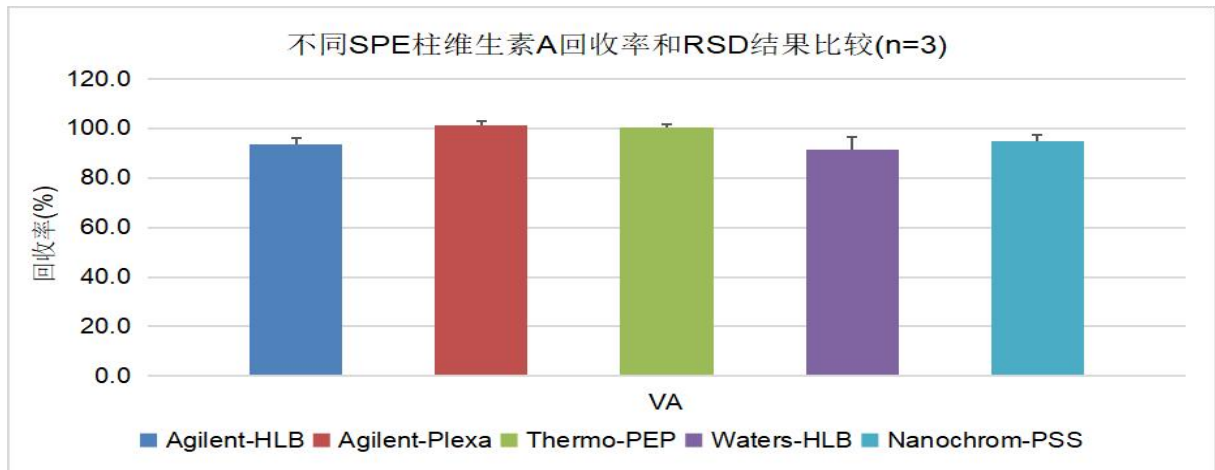


图 2 不同 SPE 柱维生素 A 回收率和 RSD 结果比较 (n=3)

2. 固相萃取柱淋洗条件优化

取 6mL 均匀分散的皂化液，分别加入等量视黄醇、VD3 和生育酚的标准样品，混合均匀后过柱，碱性皂化液上样后，需要采用足量的淋洗溶剂对碱液进行去除（用 pH 试纸测定最后淋洗流出液为中性），分别比较了采用 8mL 5%、10%、20%、30%、40%、50% 甲醇水溶液进行淋洗，考察在保证回收率的前提下，淋洗去除碱液的效果，见图 3、图 4，由实验结果可以看出，几种淋洗条件均可保证三种维生素的回收率，考虑到高水相对碱液的良好淋洗去除效果，综合不同淋洗溶剂对于共萃取基质干扰物的去除，最终选择 8mL 10% 的甲醇溶

液作为固相萃取的淋洗溶剂。

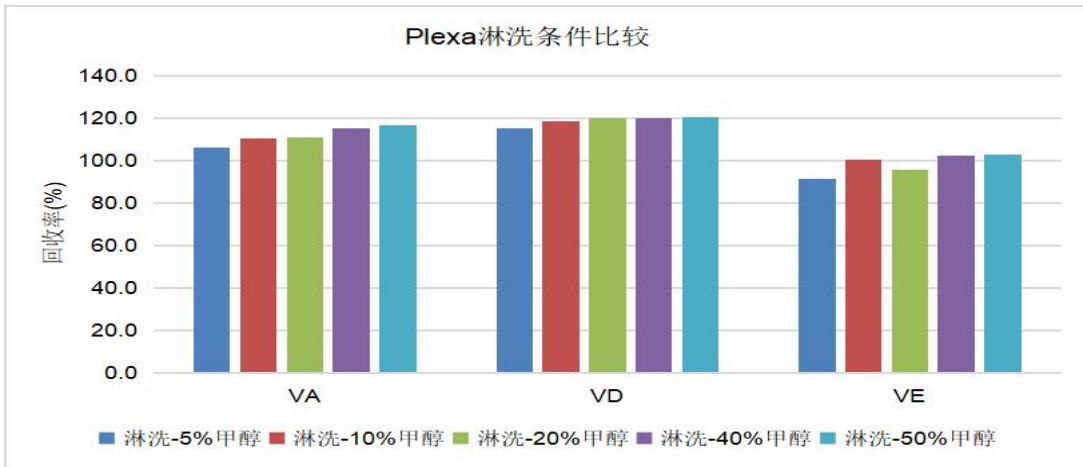


图3 Plexa 淋洗条件比较

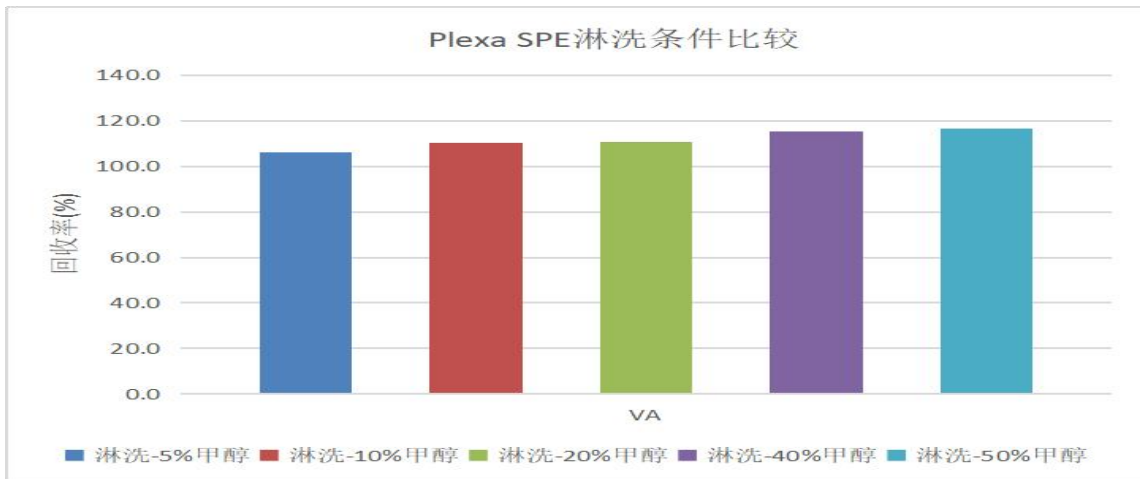


图4 VA 用 Plexa SPE 淋洗条件比较

3. 固相萃取柱洗脱溶剂优化

取 6mL 均匀分散的皂化液，分别加入等量 VA 视黄醇标准样品，混合均匀后过柱，8mL 10% 甲醇溶液充分淋洗后，抽干小柱，选择甲醇，乙腈，乙酸乙酯三种不同的溶剂各 5mL 进行洗脱，VA 洗脱后响应面积见图 5。由此选择乙腈作为本方法的洗脱溶剂。并在此基础上进行乙腈洗脱体积的优化，柱上的 3mL 乙腈可以足够保证 VA 的洗脱，见图 6。为保证良好洗脱效果，实际操作采用 3mL 乙腈分三次洗脱方式（每次 1mL），合并洗脱液，并根据饲料中维生素 A 的含量，进行氮吹浓缩。

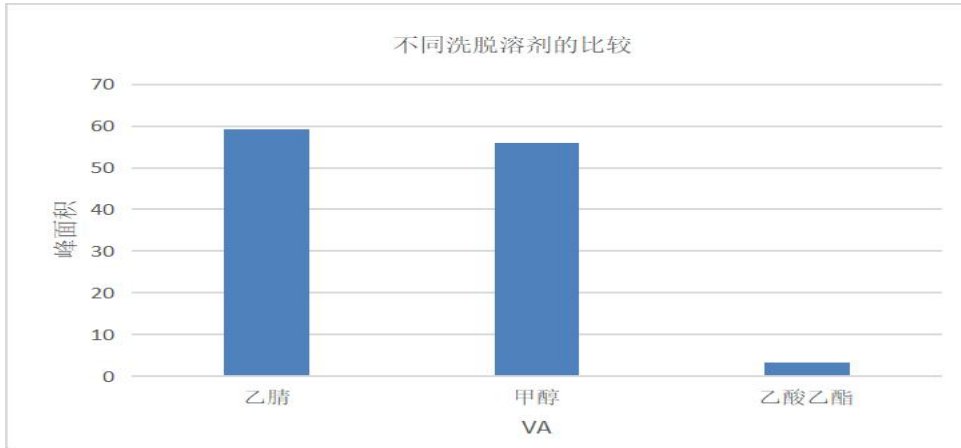


图 5 不同洗脱溶剂的比较

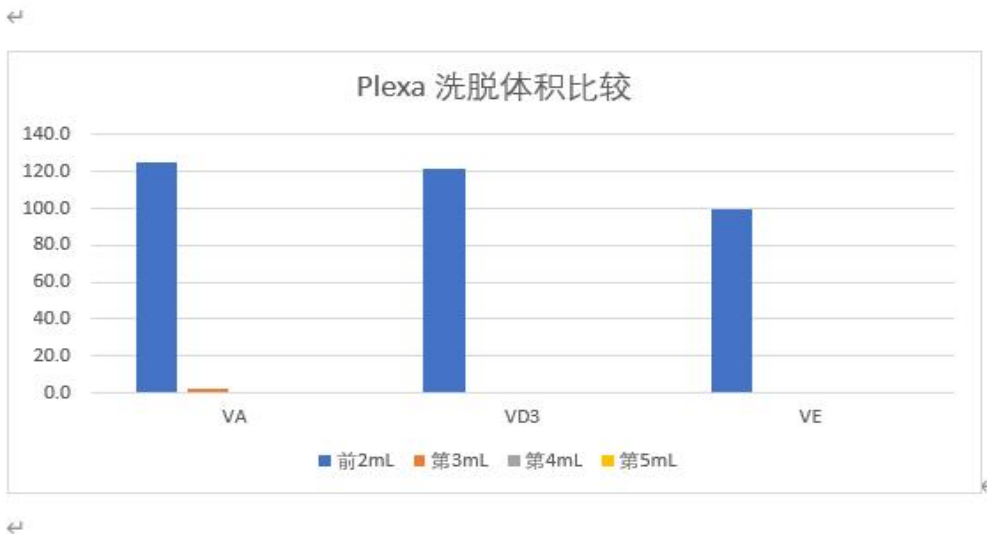


图 6 洗脱体积比较

不同品牌固相萃取小柱的填料会有差异，从而导致分析的目标物在固相萃取小柱上的保留能力不尽相同。文件中给出的淋洗条件和洗脱条件适用于 Bond Elut Plexa 萃取小柱和 Thermo PEP 萃取小柱。给出这两款商品化萃取小柱的信息不表示对该产品的认可，而是说明文本中的淋洗条件和洗脱条件并不适用于所有的固相萃取小柱，这些条件允许调整。建议使用者在使用固相萃取小柱前，先对固相萃取小柱的适用性做出评估。不论何种品牌的固相萃取小柱，在满足分析目标物回收率要求的前提下是可以使用的。

4. 维生素 A 不同浓度标准溶液与峰面积响应值线性关系

取维生素 A 标准贮备溶液，用乙醇稀释，配制系列标准工作溶液，最终浓

度分别为 0.2、0.5、1、5、10、20、50 IU/mL，按照所述色谱条件测定，结果表明，浓度在 0.2 IU/mL~50 IU/mL 范围内，峰面积(Y)与浓度(X)线性相关性良好，回归线性方程为 $Y=324.36X-20.334$ ，线性相关系数 $R^2=1$ 。标准曲线见图 7。

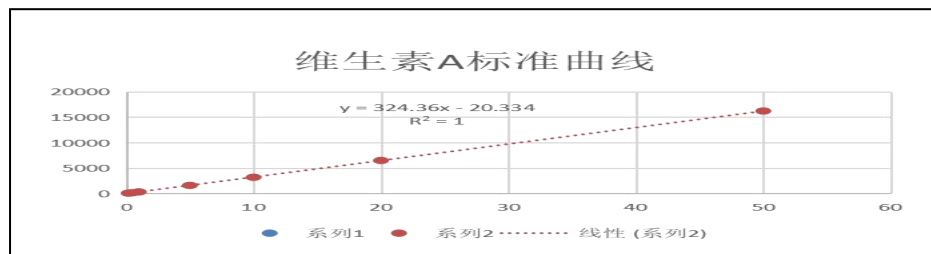


图 7 维生素 A 标准曲线

5. 回收率试验

维生素A是非极性物质，易溶于非极性溶剂中，如苯、乙醚、四氯化碳、石油醚等中，标准中所用固相萃取柱填料为聚苯乙烯/二乙烯苯聚合物，该柱耐强酸强碱，用甲醇、水活化后，将皂化液加水过柱，用10%甲醇溶液洗脱，洗掉水溶性物质及强极性化合物，再用乙腈洗脱吸附在柱上的维生素A。

原标准方法第一法定量限为1000 IU/kg，《饲料添加剂安全使用规范》（第2625号公告）中，在配合饲料或全混合日粮中的推荐添加量（以维生素计），猪1300~4000 IU/kg，肉鸡2700~8000 IU/kg，蛋鸡1500~4000 IU/kg，牛2000~4000 IU/kg，羊1500~2400 IU/kg，鱼类1000~4000 IU/kg。在猪配合饲料、产蛋鸡复合预混合饲料、猪浓缩饲料、奶牛精料补充料中，按照已知空白含量的1倍、2倍、10倍添加三个浓度，在豆粕中，按照定量限及定量限的1倍、2倍、4倍、8倍添加，在配合饲料中按照定量限、定量限的1倍、5倍添加，实验结果见表4。标准溶液色谱图见图8，豆粕中定量限添加回收色谱图见图9，配合饲料空白色谱图见图10，定量限添加回收色谱图见图11，样品溶液色谱图见图12~图19。

5.1 试样溶液的制备

按照文本4.5.1.2方法制备。

5.2 色谱参考条件一（同原标准方法）

色谱柱：C₁₈柱，长125 mm，内径4.6 mm，粒度5 μm（或性能类似的分析柱）；

流动相：甲醇+水（95+5）；

流 速：1.0 mL/min；

温 度：室温；

进样量：20 μL；

检测波长：325 nm。

5.3 色谱参考条件二

色谱柱：薄壳型 C₈柱，4.6×50 mm，2.7 μm（或性能类似的分析柱，）；

流动相：A：0.1 %甲酸水， B:乙腈， C:甲醇，梯度洗脱见表3。

流 速：1.0 mL/min；

温 度：35°C；

进样量：10 μL；

检测波长： 325 nm；

表 3 流动相洗脱梯度表

时间	0.1%甲酸水(%)	乙腈(%)	甲醇(%)	流速(mL/min)
0.0	30	70	0	1.0
1.0	25	75	0	1.0
12.0	0	100	0	1.0
14.0	0	0	100	1.0
19.0	0	0	100	1.0
20.0	30	70	0	1.0

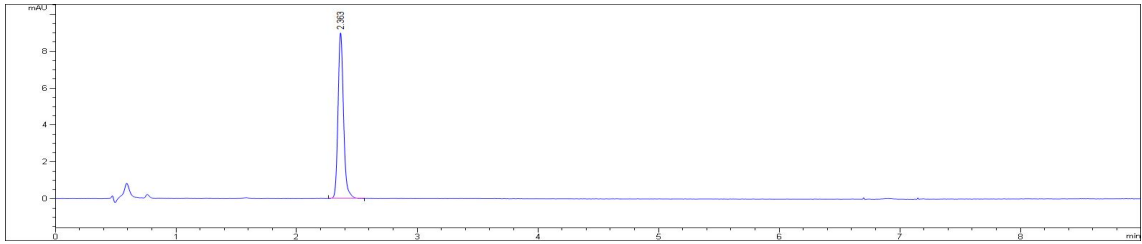


图8 维生素A标准溶液色谱图（浓度1 IU/mL，保留时间2.4 min）

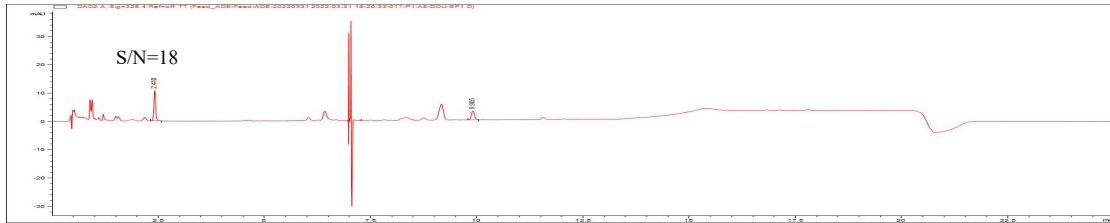


图9 豆粕中定量限添加水平（800 IU/kg）色谱图

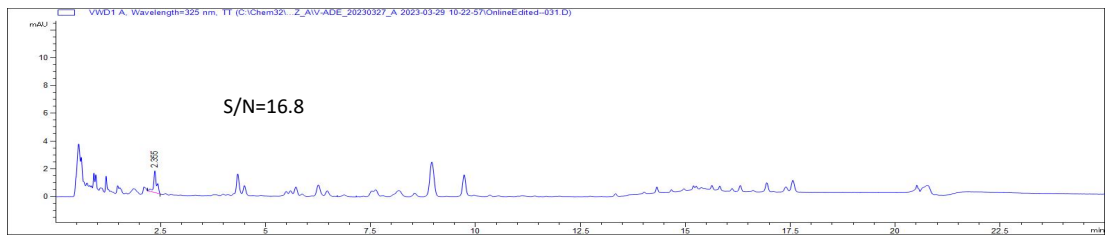


图10 配合饲料空白色谱图

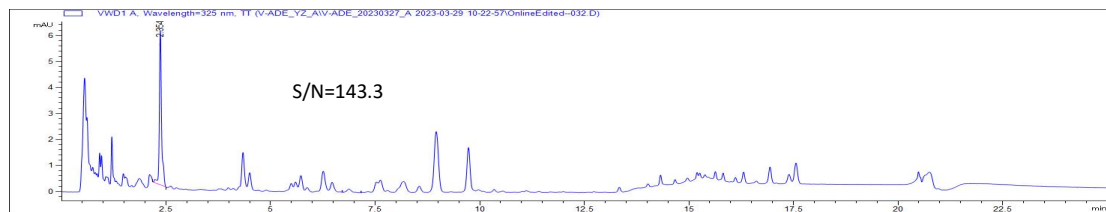


图11 配合饲料定量限添加回收率色谱图

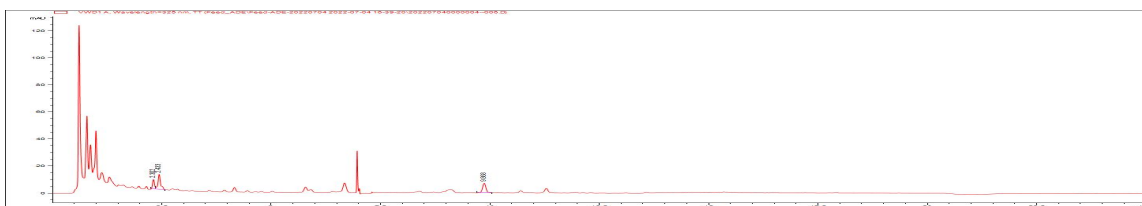


图12 猪配合饲料空白色谱图

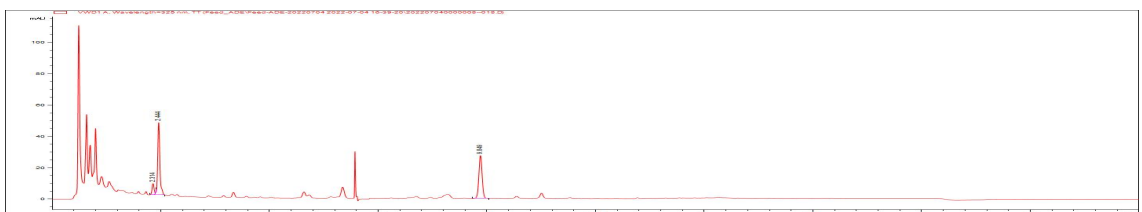


图13 猪配合饲料添加回收水平（9400 IU/kg）色谱图

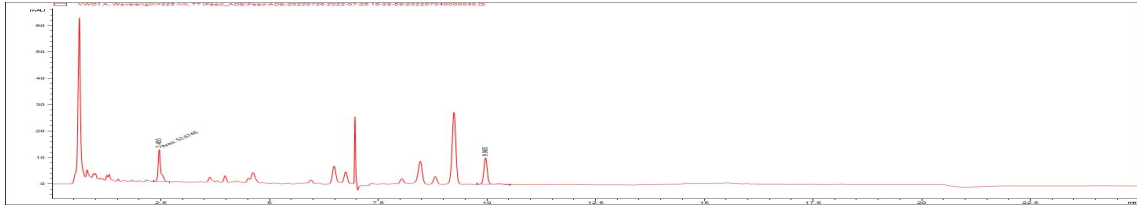


图14 精料补充料空白色谱图

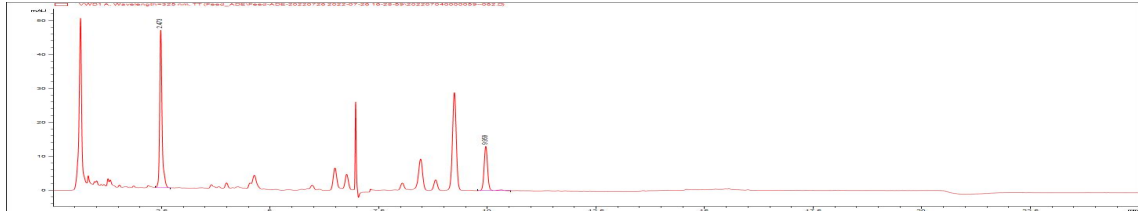


图15 精料补充料添加回收水平 (10364 IU/kg) 色谱图

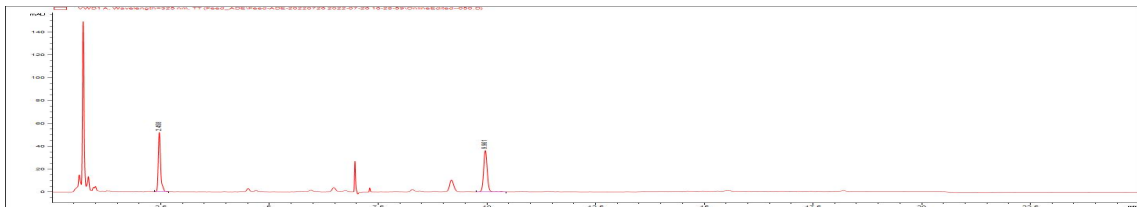


图16 浓缩饲料空白色谱图

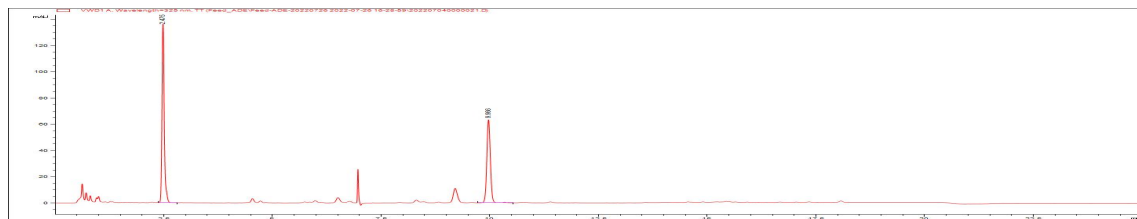


图17 浓缩饲料添加回收水平 (25800 IU/kg) 色谱图

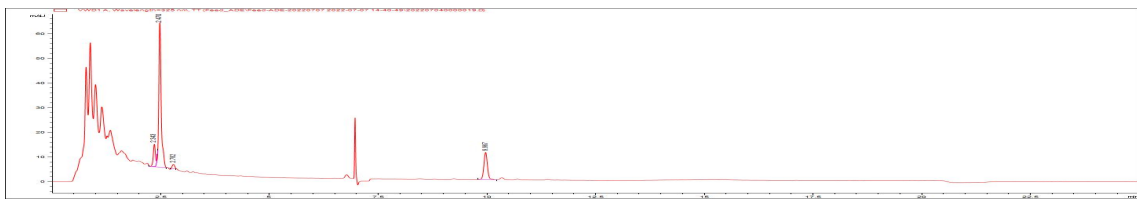


图18 复合预混合饲料空白色谱图

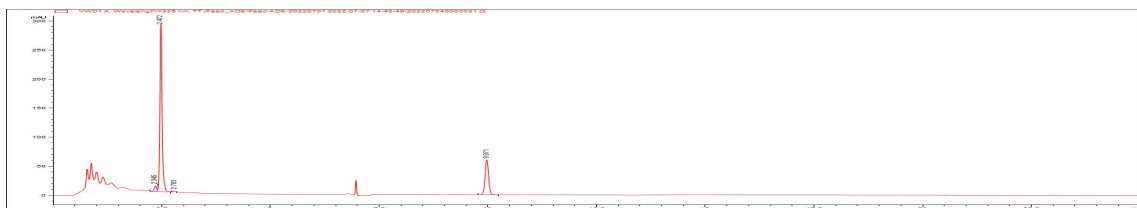


图19 复合预混合饲料添加回收水平 (641200 IU/kg) 色谱图

表 4 回收率试验结果

样品类型	空白含量 (IU/kg)	添加浓度 (IU/kg)	回收率(%)						平均回收 率(%)	RSD (%)
			1	2	3	4	5	6		
配合饲料 (猪)	4734	4700	102.30	118.80	97.30	101.90	119.00	97.30	106.10	9.56
		9400	111.00	96.70	102.20	110.90	96.60	102.20	103.27	6.24
		47000	104.20	106.90	105.40	104.30	106.70	105.50	105.50	1.08
精料补充料 (奶牛)	5182	5182	111.0	112.3	112.5	112.5	107.6	108.0	110.7	2.1
		10364	101.2	101.6	105.3	105.3	102.5	102.1	103.0	1.8
		51820	100.3	100.2	98.5	98.3	103.1	103.3	100.6	2.1
浓缩饲料 (猪)	12900	12900	98.90	98.70	94.40	98.70	98.70	94.30	97.28	2.34
		25800	99.30	93.40	94.00	99.00	93.50	94.10	95.55	2.93
		129000	92.40	86.10	88.40	92.30	85.80	88.40	88.90	3.25
复合预混和饲料 (产蛋鸡)	320575	320600	104.30	104.08	101.02	101.29	103.98	104.3	103.16	1.51
		641200	99.10	100.10	94.20	99.10	100.00	93.80	97.72	2.98
		3206000	97.20	97.80	102.70	97.10	97.70	102.40	99.15	2.67
豆粕	0	800	90.53	90.53	97.00	100.74	101.77	103.13	97.28	5.77
		1667	112.50	112.80	112.80	114.20	112.80	113.90	113.17	0.62
		3333	112.20	112.50	112.30	114.90	114.90	114.90	113.62	1.24
		6667	92.50	91.70	91.80	92.30	91.80	95.30	92.57	1.49
配合饲料	571.5	1000	98.19	100.27	102.34	102.34	100.27	100.27	100.6	1.55
		2000	93.24	92.9	95.34	95.34	93.94	93.94	94.1	1.09
		10000	103.25	103.32	108.97	108.83	97.59	97.66	103.3	4.89

从表4中可以看出，在不同添加水平下，回收率范围为85.80%~119.00%，平均回收率为88.90~113.62%，相对标准偏差为0.62~9.56%；表明方法可行，定量限添加回收结果满足原标准方法规定的定量限。

6. 重复性

同一批次样品重复六次检测结果见表5，标准偏差不大于1.71%。

表 5 同一批次重复六次检测结果

	肉牛育肥 浓缩饲料	犊牛精料 补充料	羔羊精料 补充料	仔猪配合 饲料	产蛋鸡配合 饲料	哺乳母猪 浓缩饲料
1	5745.5	14725.0	3956.2	3086.2	2125.8	9619.7
2	5745.5	14790.6	3948.0	3086.2	2134.1	9685.3
3	5745.5	14823.5	3948.0	3061.5	2142.3	9652.5
4	5581.4	15004.0	3989.0	3094.4	2101.2	9915.1
5	5581.4	15004.0	3989.0	3094.4	2101.2	9948.0
6	5548.5	14987.6	3997.2	3102.6	2101.2	9948.0
平均含量 (IU/kg)	5658.0	14889.1	3971.2	3087.6	2117.6	9794.8
标准偏差 (%)	1.71	0.83	0.58	0.46	0.89	1.61

7. 方法适用性

液液萃取和固相萃取方法，配对 t 检验结果显示，P 值为 0.17，大于 0.05，说明两种方法之间不存在显著性差异，见表 6，表明固相萃取方法满足检测结果的准确度，方法简单快速，同时降低化学试剂使用量，符合环保要求。

表 6 固相萃取和液液萃取方法测定结果对比

样品名称	维生素 A 含量(IU/kg)		
	固相萃取	液液萃取	配对 t 检验 P 值
仔猪后期复合预混料	1.96×10^5	1.94×10^5	0.17
产蛋鸡复合预混料	1.93×10^5	2.22×10^5	
5%羊复合预混料	1.81×10^5	1.73×10^5	
肉羊浓缩饲料 688	2.04×10^4	2.26×10^4	
妊娠母猪浓缩饲料 A7	2.24×10^4	2.28×10^4	
仔猪配合饲料 313	3.39×10^3	3.09×10^3	
怀孕母猪配合饲料	7.52×10^3	8.61×10^3	
母羊繁殖期精料补充料	1.90×10^4	2.08×10^4	
肉牛繁殖精料补充料	9.93×10^3	8.98×10^3	

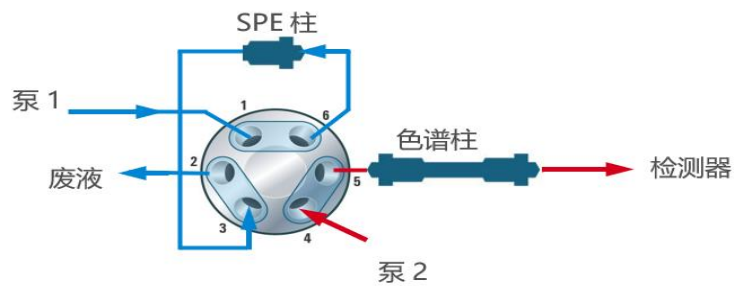
8. 方法再现性

按照文件中规定的方法，在河南省兽药饲料监察所、北京市饲料兽药监察所、辽宁省兽药饲料畜产品质量安全检测中心方法验证符合要求，表明四个实验室比对实验有较好的再现性。见验证报告。

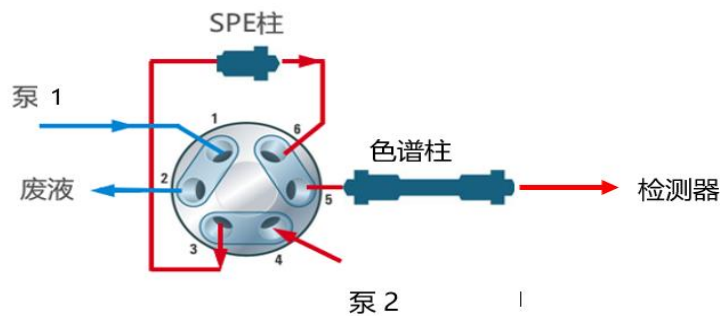
(二) 在线固相萃取法验证

该方法的优点是样品皂化后，经在线固相萃取柱富集、分离、净化，高效液相色谱测定，前处理简单，自动化程度高，测定结果准确，可靠。在线固相萃取色谱条件三在色谱条件二基础上再增加一个四元泵和二位六通阀，在线的固相萃取小柱及分析色谱柱前各需要一个在线过滤器。在线萃取流程图见图 20。

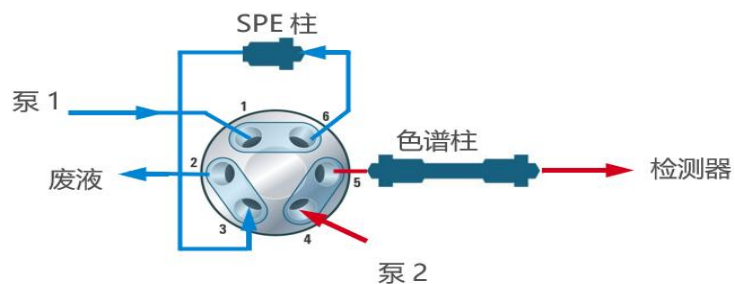
图 20 在线萃取流程图



第一阶段：洗脱注入 SPE 小柱的碱液及极性大的物质



第二阶段：将 SPE 柱内的 VA 等物质洗脱至色谱柱内



第三阶段：VA 在色谱柱内分离后，进入检测器检测

1. 试样溶液的制备

按照文件 4.5.1.2.3 中规定方法制备试样溶液。

2. 色谱参考条件

按照文件 4.5.2.3 中色谱参考条件三规定。

3. 维生素 A 不同浓度标准溶液与峰面积响应值线性关系

取维生素 A 标准贮备溶液，用乙醇稀释，配制系列标准工作溶液，见表 7，按照所述色谱条件测定，结果表明，浓度在 0.16~16.0IU/mL 范围内，峰面积 (Y) 与浓度 (X) 线性相关性良好，回归线性方程为 $Y=199.24X+13.18$ ，线性相关系数 $R^2=0.9999$ 。标准曲线见图 21，维生素 A 标准溶液色谱图见图 22。

表 7 维生素 A 标准溶液线性

维生素 A 标准溶液浓度 (IU/mL)	峰面积
0.16	37.367
0.40	92.852
0.80	185.157
1.6	350.773
4.0	795.807
8.0	1612.537
16.0	3199.527

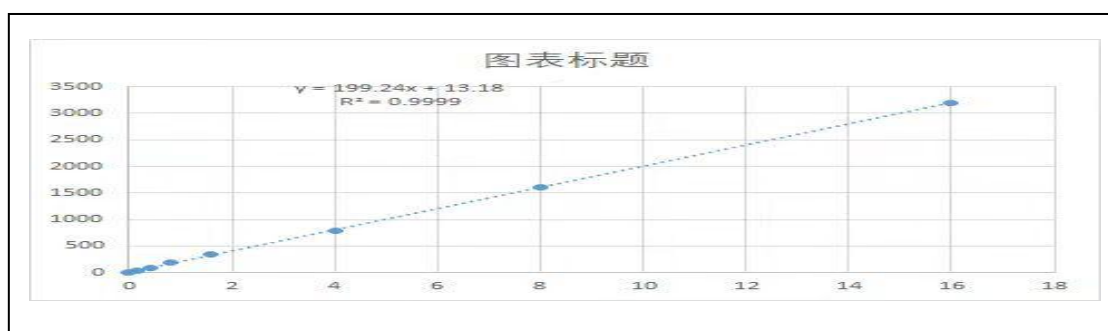


图 21 维生素 A 标准曲线

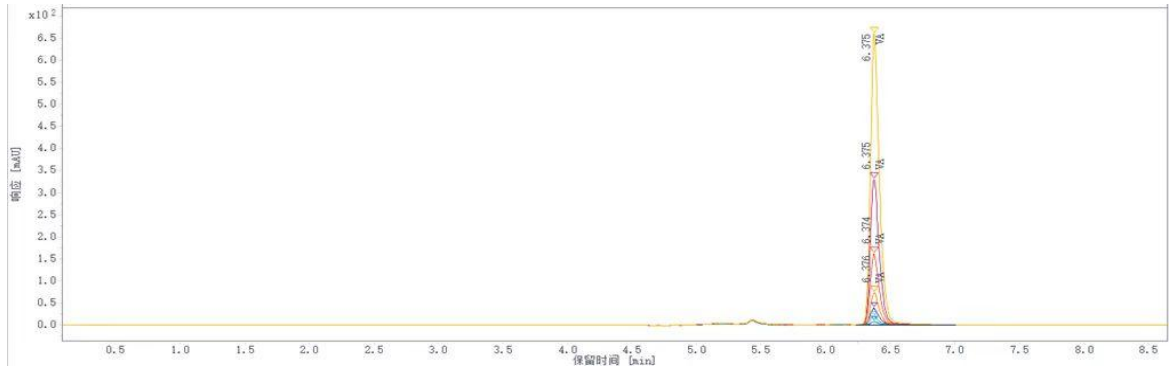


图 22 维生素 A 标准溶液色谱图

4. 回收率试验

由生产企业用 50 万 IU/g 维生素 A 乙酸酯微粒添加浓度分别为 70000IU/kg、169000IU/kg，添加到两批饲料样品中，考察方法准确度，测得两个添加浓度平均回收率为 99.99%、103.0% ，检测结果见表 8,色谱图见图 23、图 24。

表 8 添加回收率试验结果

样品名	添加水平 (IU/kg)	测定值 (IU/kg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
124A	70000	75466	107.8	99.99
		67257	96.08	
		67253	96.08	
1410A	169000	187262	110.8	103.0
		157492	93.19	
		179060	106.0	

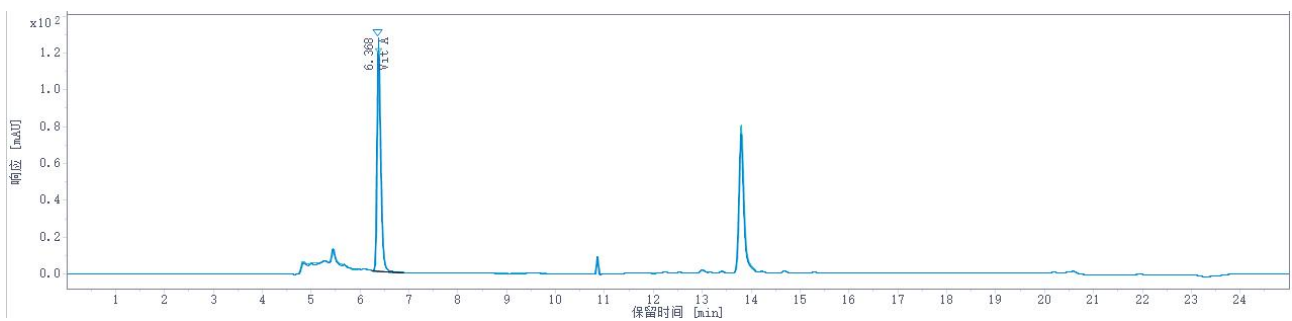


图 23 样品 124A 色谱图

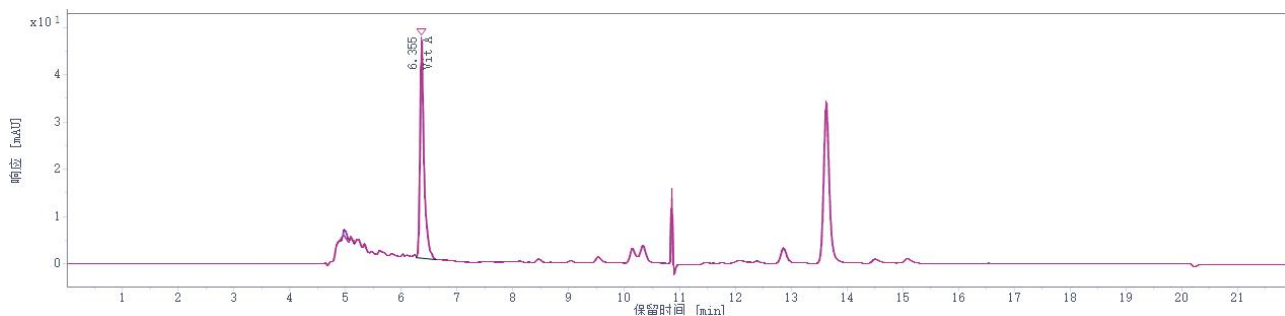


图 24 样品 1410A 色谱图

我们选择肉鸡配合饲料，按标准规定方法皂化，在皂化液中添加 VA 标样，VA 标样的添加量与皂化液中所含 VA 的含量相当，测定的回收率为 95.5%，满足分析方法的要求，说明在线净化过程未造成 VA 的损失，方法准确可靠。选用猪复合预混合饲料、宠物饲料、鸡配合饲料做添加回收率实验，回收率范围为 85.5%~101.7%，表明该方法能满足分析要求，检测结果见表 9。色谱图见图 25、图 26，VA 标准曲线见图 27，样品色谱图见图 28、图 29、图 30。

表 9 不同样品添加回收率试验

样品类型	本底值 (IU/kg)	实测值 (IU/kg)	加标量 (IU/kg)	加标回收率 (%)
猪复合预混合饲料	539244	851744	348837	89.6
	161337	508721	348837	99.6
	219477	290698	488372	92.5
	239826	488372	290698	85.5
	311047	582849	290698	93.5
宠物饲料 (猫)	52326	392442	348837	97.5
	40698	203488	174419	93.3
	64680	215116	174419	86.3
	45058	200581	174419	89.2
	61047	238372	174419	101.7
禽类配合饲料	20349	187500	174419	95.8
	17442	172965	174419	89.2
	14535	181686	174419	95.8
	26163	193314	174419	95.8
肉鸡配合饲料	9400	17954	9400	95.5

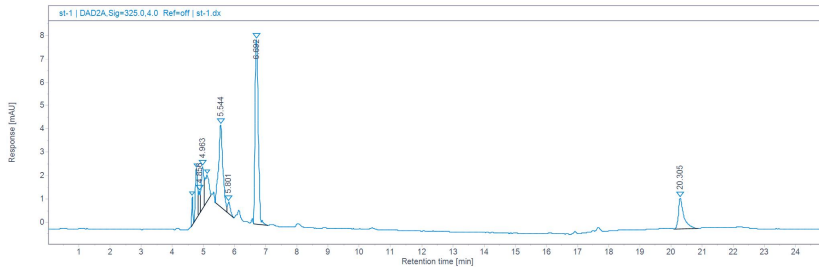


图 25 肉鸡配合饲料色谱图

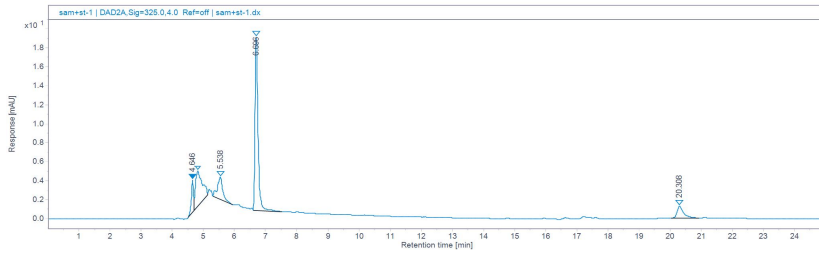


图 26 肉鸡配合饲料添加 (9400IU/kg) 色谱图

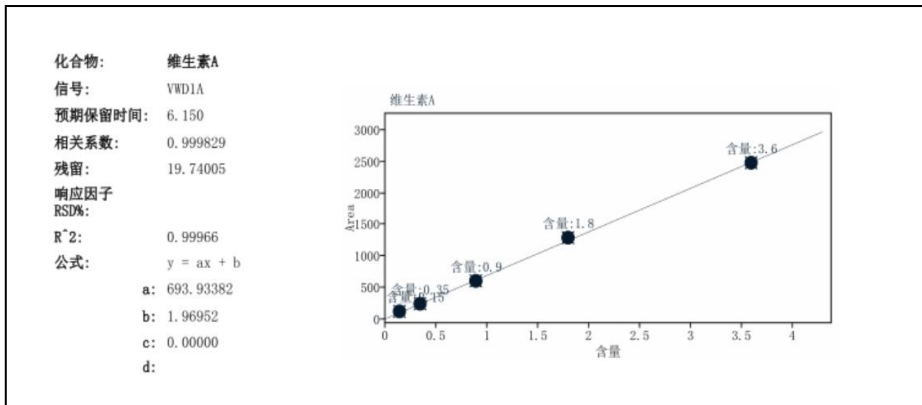


图 27 VA 标准曲线

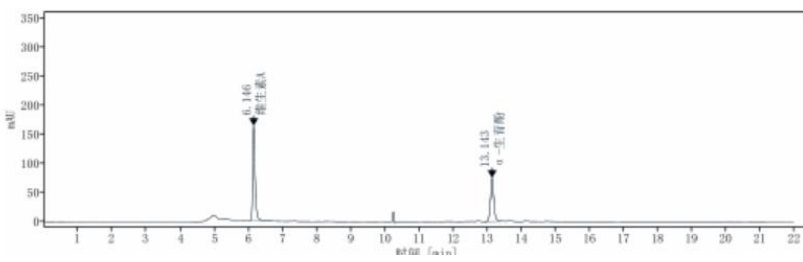


图 28 猪复合预混合饲料色谱图

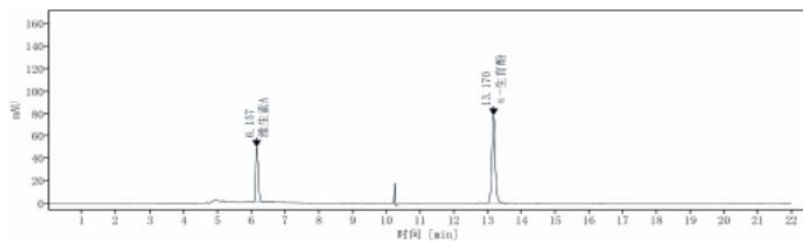


图 29 宠物饲料 (猫) 色谱图

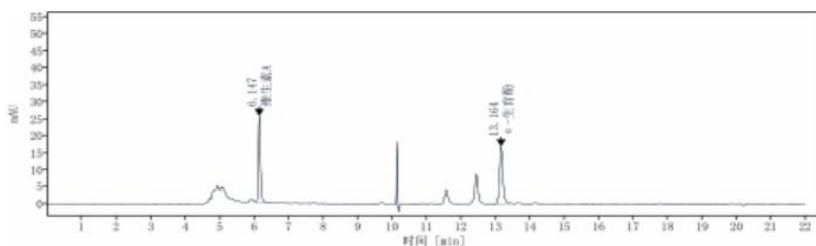


图 30 禽类配合饲料色谱图

5. 重复性

同一批次样品重复 10 次检测结果见表 10，标准偏差不大于 0.69%，变异系数为 3.37%，10 次检测数据变异程度小，重复性好，表明方法可行。

表 10 同一批次试样重复 10 次检测结果

试样编号	维生素 A(IU/g)	平均值(IU/g)	标准偏差 (%)	相对标准偏差 RSD(%)
1	20.89	20.62	0.69	3.37%
2	20.15			
3	19.94			
4	20.15			
5	21.38			
6	21.24			
7	19.63			
8	21.12			
9	20.09			
10	21.56			

6. 与现行国标方法检测结果比较

选取八批饲料样品，按照国标方法 GB/T17817-2010 和本文件规定的在线萃取方法测定维生素 A 含量，测定结果见表 11，样品色谱图见图 31。

表 11 与国标方法测定结果比较

	国 标 方 法 (GB/T17817-2010)(IU/kg)	在线固相萃取法 (IU/kg)	平均值 (IU/kg)	配对 t 检验 P 值
饲料-1	9540	9735	9638	0.08
饲料-2	14200	13890	14045	
B214 妊娠母猪浓缩饲料	22800	16888	19844	
B164 怀孕母猪配合饲料	8610	6898	7754	
B203 肉牛繁殖精料补充料	8980	8273	8626.5	
B202 母羊繁殖期精料补充料	20800	19780	20290	
B209 肉羊浓缩饲料 688	22600	22197	22398.5	
复合预混合饲料	66700	67257	66978.5	

比较两种方法测定结果，配对 t 检验结果显示，P 值为 0.08，大于 0.05，说明两种方法之间不存在显著性差异，表明方法可行。

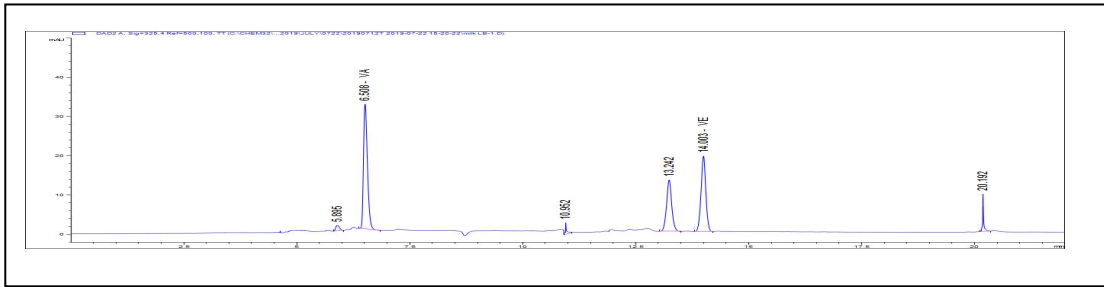


图 31 在线固相萃取法色谱条件测定试样溶液中维生素 A 的色谱图

7.方法再现性

按照文件中规定的方法，在上海天祥质量技术服务有限公司、钛和中谱检测技术（江苏）有限公司、苏州市农产品质量安全监测中心方法验证符合要求，表明四个实验室比对实验有较好的再现性。见验证报告。

（三）直提法方法验证

原标准中规定直提方法适用于维生素预混合饲料中维生素 A 乙酸酯的检测，本文件验证了复合预混合饲料用直提方法检测的可行性，在检测中发现温度过高，可能造成检测结果偏低，经过实验验证，将超声提取温度由 65 °C 改为室温，用甲醇溶液提取，试液注入高效液相色谱柱，用紫外检测器或二极管矩阵检测器，在 326 nm 处外标法检测维生素 A 的含量，样品提取后需尽快测定。

1.试样溶液的制备

称取复合预混合饲料样品（5~10 g），精确到 0.001 g，于 250 mL 棕色容量瓶中，维生素预混合饲料样品（0.5~1g），精确到 0.0001 g，置于 100 mL 棕色容量瓶中，加入约 2/3 容量瓶体积的甲醇，瓶塞不要拧紧，于室温超声波水浴中超声提取 30 min，冷却至室温，用甲醇稀释至刻度，充分摇匀，将溶液过 0.2 μm 滤膜，进样测定。

如果维生素A的标示量低于10000000 IU/kg，则将溶液过0.2 μm 滤膜，进样分析。否则需将溶液用甲醇进一步稀释，使维生素A的进样浓度在3.44~34.4 $\mu\text{g/mL}$ (10~100 IU/mL)之间，供高效液相色谱仪分析，维生素A的光谱扫描图见图32，维生素A标准色谱图见图33，维生素预混合饲料色谱图见图34，复合预混合饲料色谱图见图35、图36、图37。

2. 色谱参考条件：

同原标准方法规定的色谱条件。

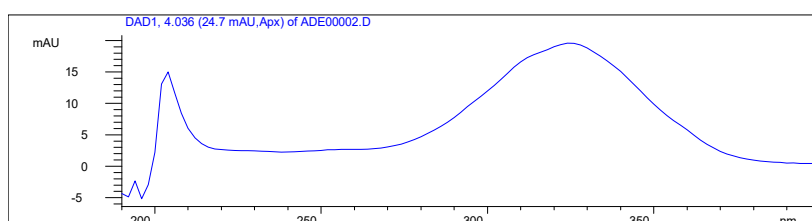


图 32 维生素 A 乙酸酯光谱扫描图

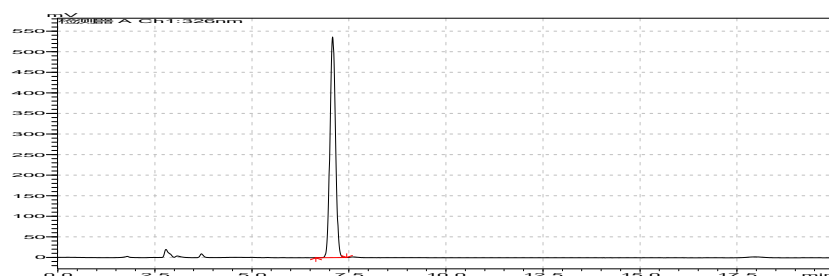


图 33 维生素 A 乙酸酯标准溶液色谱图

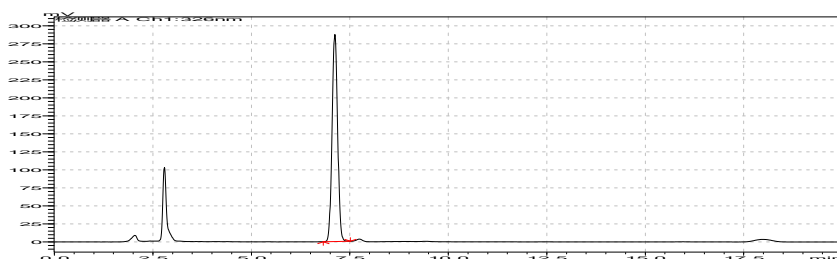


图 34 维生素预混合饲料中维生素 A 乙酸酯色谱图

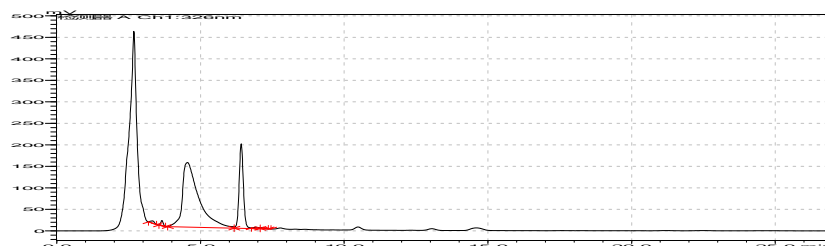


图 35 复合预混合饲料中维生素 A 乙酸酯色谱图

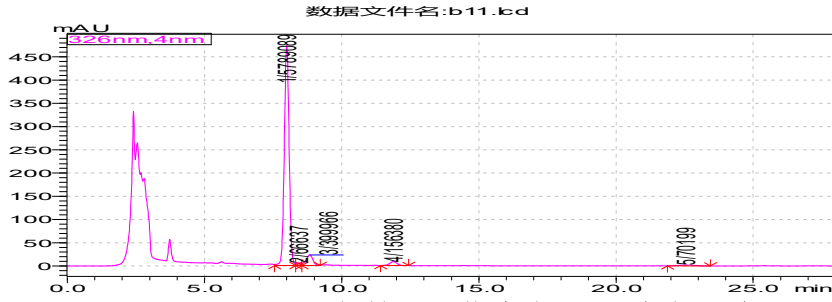


图 36 预混料 1号维生素 A 乙酸酯色谱图

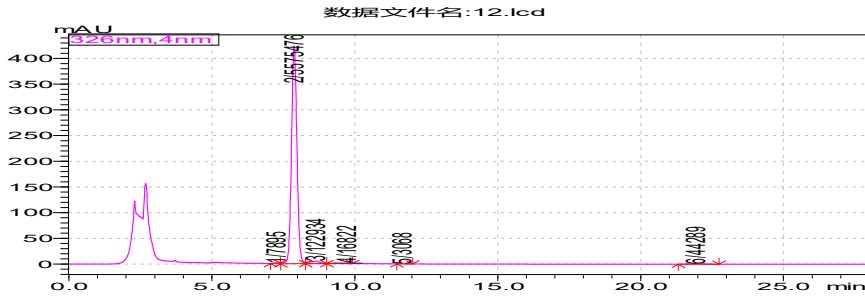


图 37 ds-1 预混料维生素 A 乙酸酯色谱图

3. 检出限与定量限

将复合预混合饲料进行稀释，当维生素 A 乙酸酯浓度为 0.0616 IU/mL 时，信噪比为 3.0，按取样量及稀释比例计算检测方法检出限为 1540 IU/kg，定量限为 5133 IU/kg，根据实际产品含量，定量限定为 2 万 IU/kg。检出限图谱见图 38。

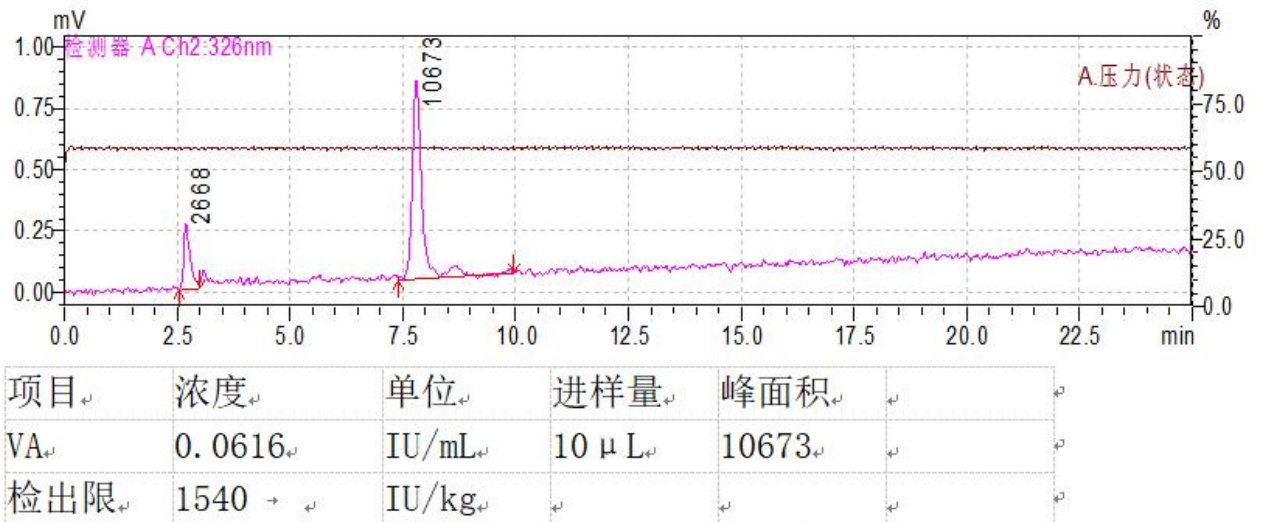


图 38 检出限图谱

4. 维生素 A 不同浓度标准溶液与峰面积响应值线性关系

标准曲线 1: 标准曲线点(5 标准点): 1155.07IU/L、2887.68IU/L、5775.36IU/L、14438.4IU/L、28876.8IU/L。见图 39。

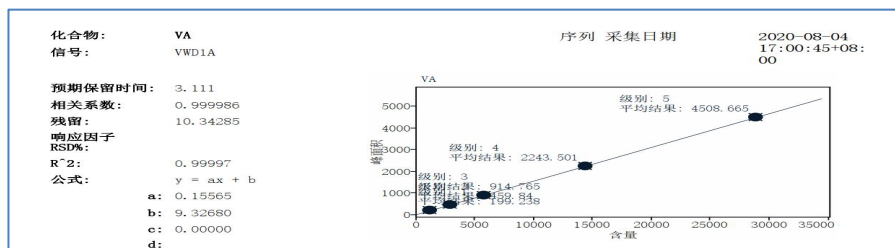


图 39 标准曲线 1

标准曲线 2: 标准曲线点(6 标准点): 1155.07IU/L、2887.68IU/L、5775.36IU/L、14438.4IU/L、28876.8IU/L、57753.6IU/L。见图 40。

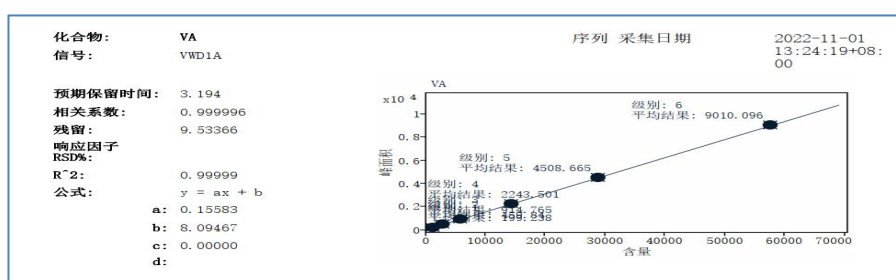


图 40 标准曲线 2

标准曲线 3: 标准曲线点 (5 标准点) : 8407.77IU/L、15815.55IU/L、33631.1IU/L、43238.87IU/L、168155.5IU/L。见图 41。

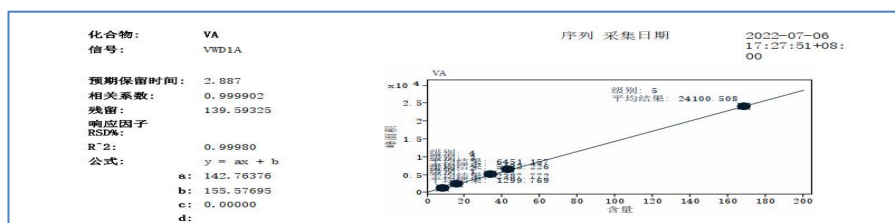


图 41 标准曲线 3

以上不同浓度标准曲线相关系数达到 0.9999 以上，浓度和峰面积之间存在很好的线性，其中标准曲线 2 可以涵盖所有的预混料样品而不用二级稀释。

5. 复合预混合饲料测定回收率

通过对不含脂溶性维生素复合预混合饲料中添加不同浓度维生素 A 乙酸酯，探讨用甲醇直接提取检测维生素 A 乙酸酯的回收率，按照维生素 A 乙酸酯添加浓度为 2 万/kg、20 万/kg 和 100 万/kg 做添加回收，结果表明维生素 A 乙酸

酯的加标回收率满足检测准确度要求，检测结果见表 12。

表 12 复合预混合饲料中维生素 A 乙酸酯加标回收率

样品组别	检测结果 (万 IU/kg)	扣减空白后结果 (万 IU/kg)	理论添加 (万 IU/kg)	平均相对偏差 (%)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
组 1	2.34	2.32	2.222	3.33	104.30	103.29
	2.27	2.25			101.35	
	2.33	2.31			103.92	
	2.32	2.30			103.45	
	2.32	2.30			103.43	
组 2	23.00	22.98	22.22	3.32	103.41	103.31
	22.91	22.89			102.99	
	22.89	22.88			102.94	
	23.54	23.52			105.86	
	22.54	22.52			101.33	
组 3	108.24	108.22	111.10	2.58	97.40	97.42
	107.15	107.13			96.42	
	109.02	109.00			98.11	
	108.12	108.10			97.29	
	108.74	108.72			97.85	
空白	0.02					

6. 干扰实验

根据农业部 2625 号公告，选取最极端浓度，配合饲料中铁 750 mg/kg，铜 125 mg/kg，则 1%的复合预混合饲料含一水硫酸亚铁 250 mg/g，含碱式氯化铜 21.6 mg/g，按检测时称样 3 克计算则样品中含一水硫酸亚铁 750 mg，含碱式氯化铜 64.8 mg。

1) 称取一水硫酸亚铁 7.5 g 和碱式氯化铜 0.648 g 加入 100 mL 容量瓶中，加水 80 mL，室温超声溶解半小时，冷却至室温，用水定容。

2) 移取 10 mL 溶液 1 加入待制备的维生素 A 标准溶液中，然后定容，摇匀。上机测定，维生素 A 乙酸酯标准溶液见图 42，加入 10 mL 溶液 1 色谱图见图 43。测三个平行。

3) 称取一水硫酸亚铁 7.5 g 和碱式氯化铜 0.648 g 加入 100 mL 容量瓶中，加甲醇 80 mL，室温超声溶解半小时，冷却至室温，用甲醇定溶。

4) 移取 10 mL 溶液 3 加入待制备的维生素 A 乙酸酯标准溶液中，然后定容，摇匀。上机测定，见图 44。测三个平行。

5) 称取一水硫酸亚铁 0.75 g 和碱式氯化铜 0.0648 g 加入待制备的维生素 A 标准溶液中，然后定容，摇匀。上机测定。

通过以上实验来测定铜、铁离子对维生素 A 测定的影响，测定结果见表 13。

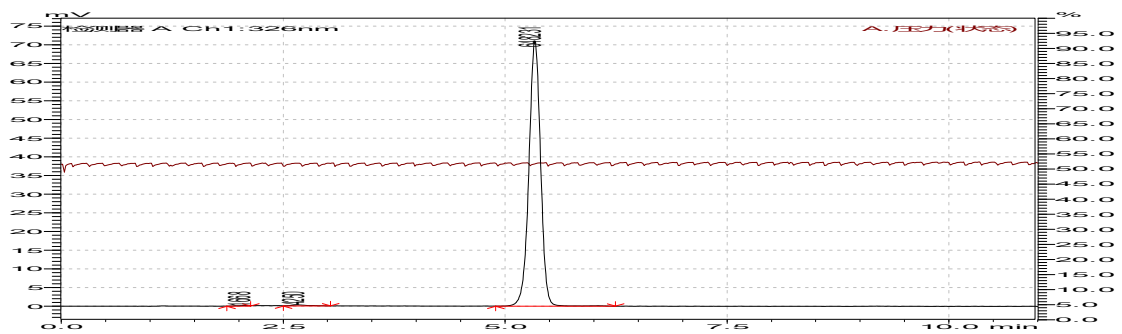


图 42 维生素 A 乙酸酯标准溶液色谱图

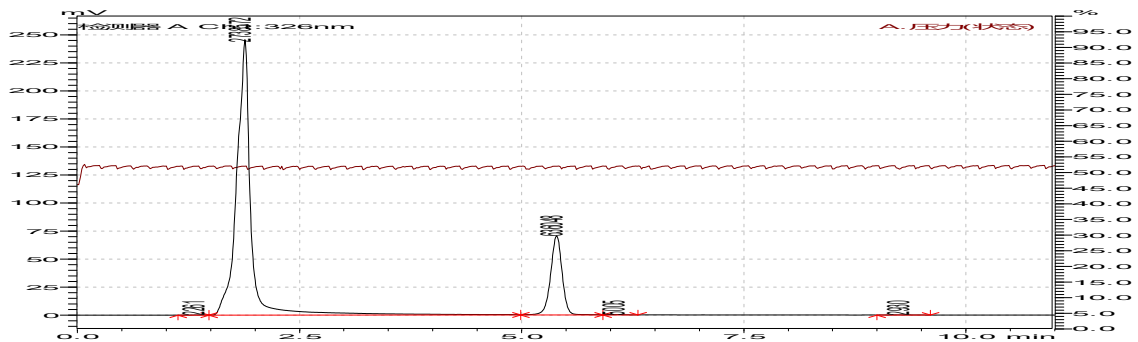


图 43 维生素 A 乙酸酯标准溶液中加入 10mL 铜、铁离子水溶液色谱图

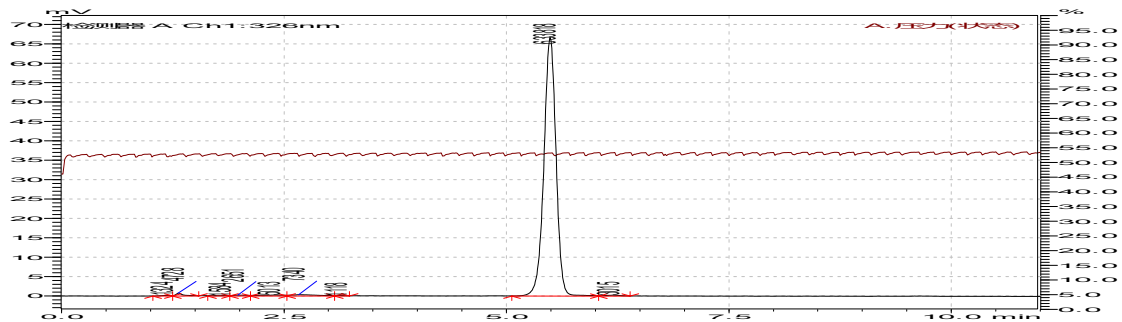


图 44 维生素 A 乙酸酯标准溶液中加入 10 mL 铜、铁离子甲醇溶液色谱图

表 13 铜、铁离子干扰实验结果

	峰面积	峰面积平均值	与标准溶液 相对偏差(%)
VA 标准溶液	648231	648231	2.3
VA 标准溶液+铜铁水溶液 (溶液 2)	636048	619250	
	612220		
	619105		
VA 标准溶液+铜铁甲醇溶 液(溶液 4)	609625	633303	1.2
	633818		
	630315		
VA 标准溶液	645021	645021	0.3
VA 标准溶液+铜铁 (溶液 5)	646348	641741	
	636217		
	642657		

在标准溶液中加入铜、铁离子水溶液，峰面积相对偏差为 2.3%，加入铜、铁离子甲醇溶液，峰面积相对偏差为 1.2%，直接在标准溶液中加入铜、铁离子，峰面积相对偏差为 0.3%；根据实验结果，铜、铁离子对复合预混合饲料的检测没有影响。

7. 不同的提取时间的影响

原标准中规定超声提取时间为 30 min，时间过长则影响维生素的检测，因此检测时既要保证维生素 A 提取完全，又要保证提取后不受光和热的影响而损失，我们对 5%蛋鸡复合预混合饲料 H 样品分别超声提取 35min 后结果降解，30 min~35min 检测结果满足要求，因此文中规定超声时间为 30 min。测定结果见表 14。

表 14 不同提取时间对检测结果的影响

提取处理时间 (min)	VA	均值	理论值	占理论值	相对偏差
	(万 IU/kg)	(万 IU/kg)	(万 IU/kg)	%	%
25	22.80	21.05	21	100.00	0
	19.32				
	21.01				
30	20.76	20.69			
	21.08				
	20.23				
35	21.22	21.21			
	22.70				
	19.70				
40	18.37	18.13			
	18.43				
	17.58				
检测依据	GB/T 17817-2010				
判定允许相对偏差	10~50 万 IU/kg: 20%				

8 不同提取温度的影响

在检测中发现，超声提取温度对维生素 A 乙酸酯检测结果影响明显，主峰后会现出色谱峰，且随着超声提取温度的升高，该色谱峰面积也会增大。在维生素 A 乙酸酯原料国标中，超声提取温度是 45℃，选择不同厂家生产的维生素 A 乙酸酯原料，分别在室温、45℃、65℃超声波水浴中用甲醇超声提取 30 min，结果显示室温超声提取测定结果，主峰后小峰面积最小，测定结果见表 15，K 厂家色谱图见图 45~47，D 厂家色谱图见图 48~50。

五个批次维生素预混合饲料及复合预混合饲料在不同温度下提取，室温超声提取测定结果，也是主峰后小峰面积最小，测定结果见表 15，色谱图见图 51~59。根据实验结果，将提取温度改为室温。

表 15 不同超声温度维生素 A 乙酸酯原料测定结果

生产厂家	提取温度	VA 主峰	主峰后小峰	小峰占百分比 (%)	检测结果 (%)
K 厂家	常温	3076355	12523	0.41	102.98
	45℃	3110320	86883	2.79	99.11
	65℃	2386399	411851	17.26	79.3
D 厂家	常温	3148299	18574	0.59	99.95
	45℃	3347750	98381	2.94	95.85
	65℃	2201924	425860	19.34	75.05

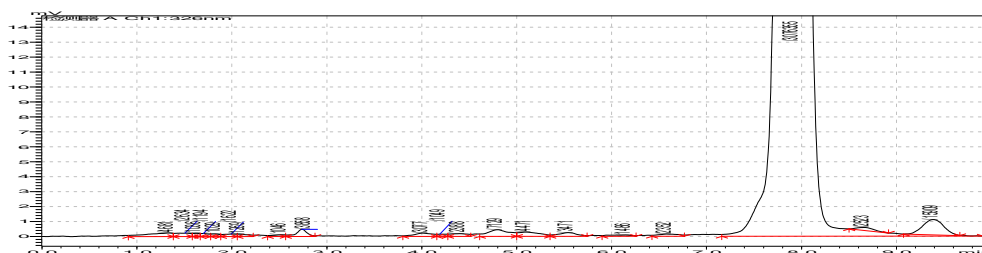


图 45 K 厂家常温提取色谱图

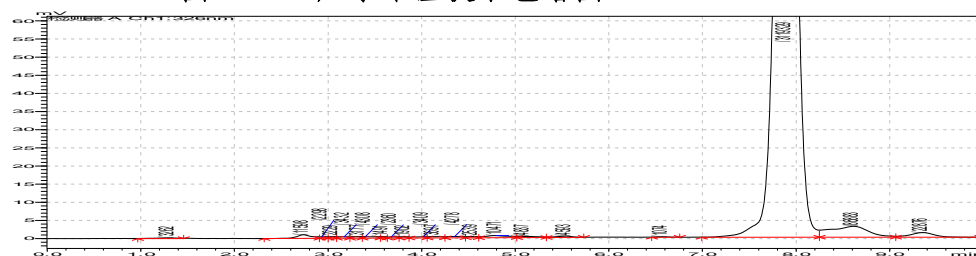


图 46 K 厂家 45℃提取色谱图

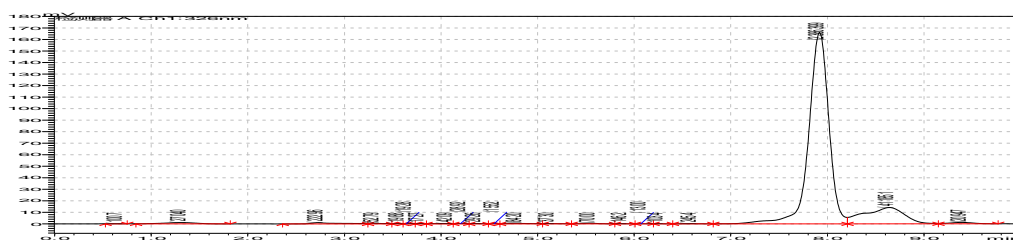


图 47 K 厂家 65℃提取色谱图

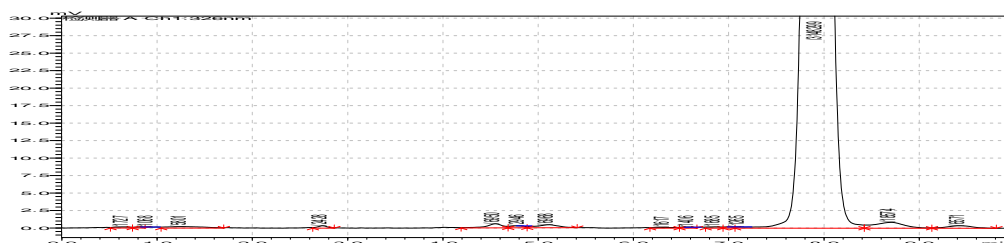


图 48 D 厂家常温提取色谱图

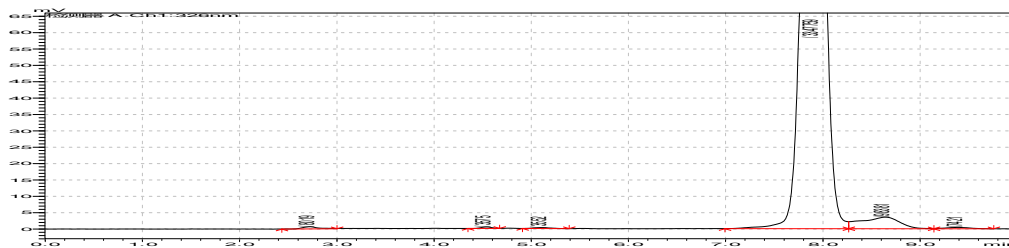


图 49 D 厂家 45℃提取色谱图

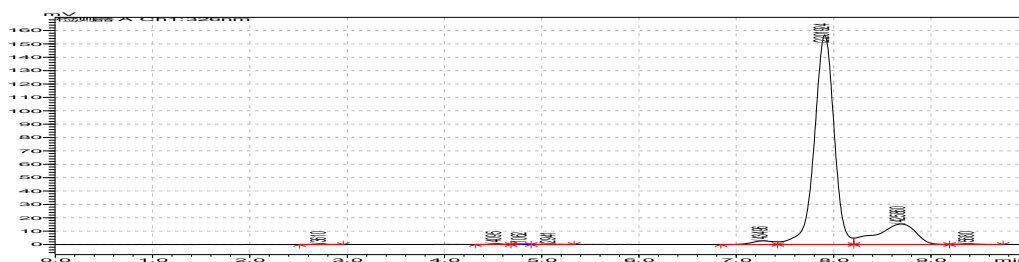


图 50 D 厂家 65℃提取色谱图

表 16 不同超声温度样品测定结果

样品名	提取温度	小峰占百分比 (%)
维生素预混合饲料 1 号	室温	0.43
	45℃	0
	65℃	1.02
维生素预混合饲料 2 号	室温	4.50
	45℃	4.86
	65℃	5.52
宠物维生素预混合饲料	室温	0.97
	45℃	1.54
	65℃	9.44
蛋小鸡复合维生素	室温	1.37
	45℃	1.89
	65℃	10.2
复合预混合饲料	室温	9.13
	45℃	11.44
	65℃	11.97

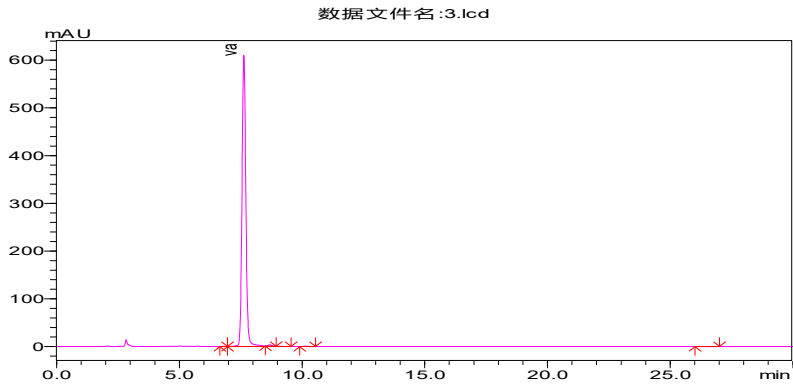


图 51 维生素预混合饲料 1 号室温提取色谱图

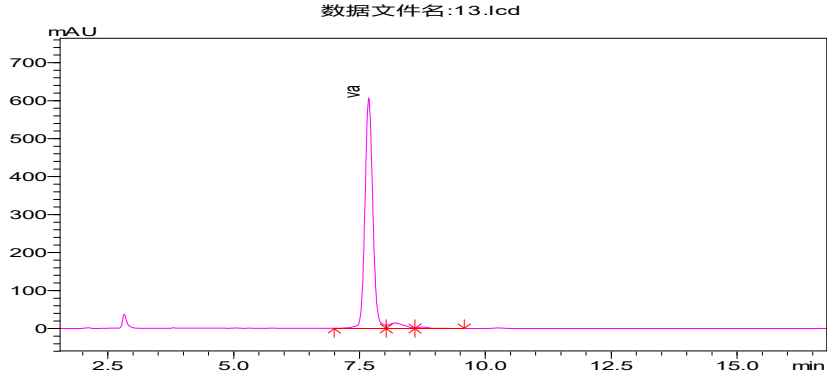


图 52 维生素预混合饲料 1 号 45℃提取色谱图

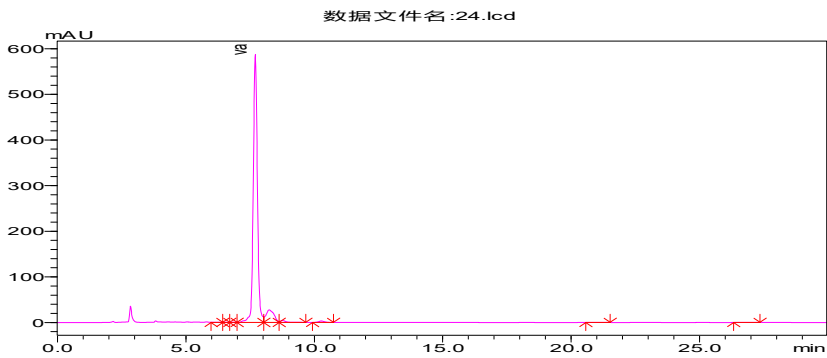


图 53 维生素预混合饲料 1 号 65℃提取色谱图

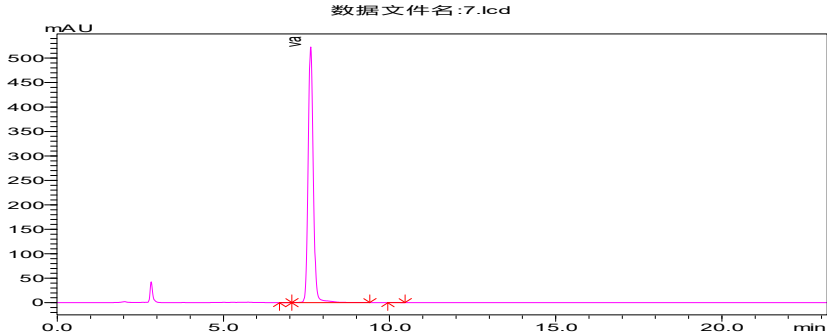


图 54 维生素预混合饲料 2 号室温提取色谱图

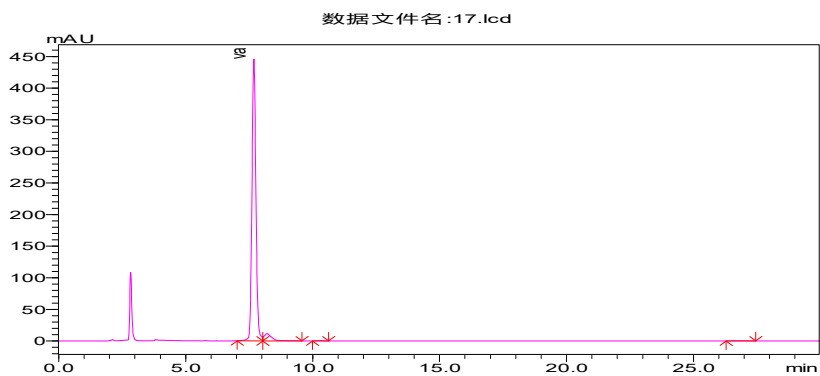


图 55 维生素预混合饲料 2 号 45℃提取色谱图

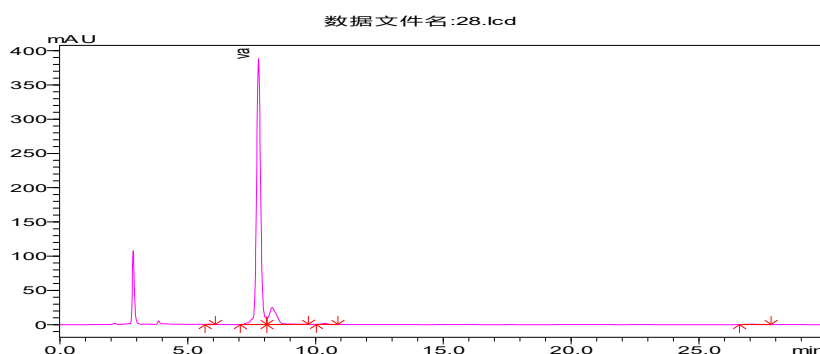


图 56 维生素预混合饲料 2 号 65℃提取色谱图

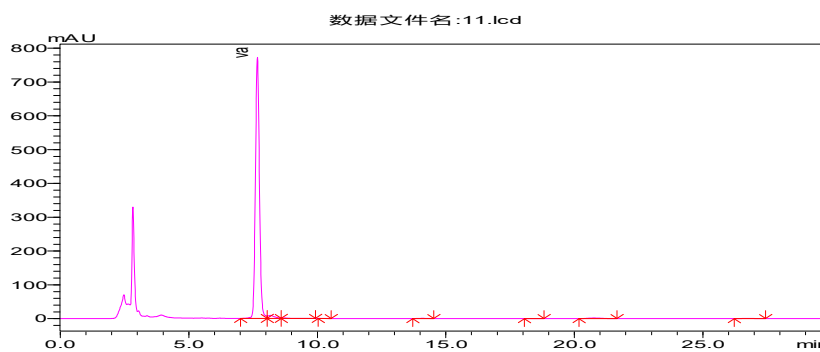


图 57 复合预混合饲料样品室温超声提取

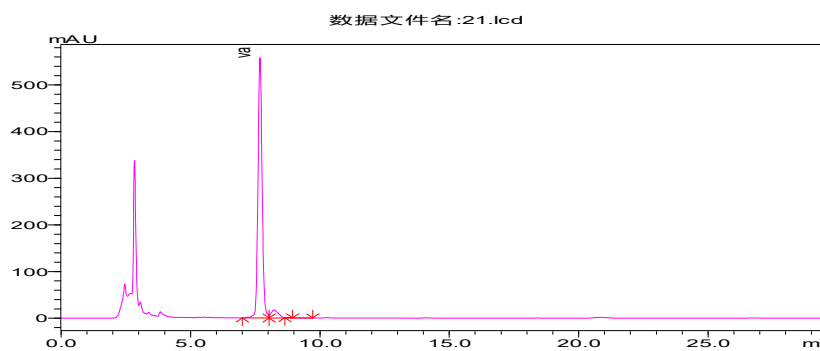


图 58 复合预混合饲料样品 45℃超声提取

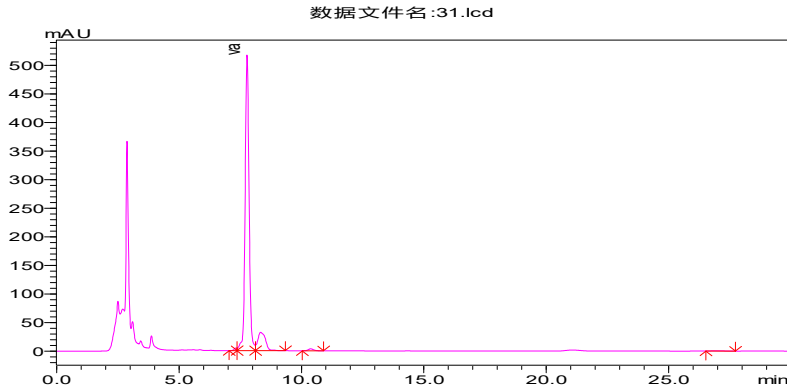


图 59 复合预混合饲料样品 65℃超声提取

9 方法重复性

按照本文件规定的方法检测复合预混合饲料，每个样品重复测定六次，考查方法准确度与精密度，检测结果见表 17。

表 17 实际样品准确度与精密度检测结果

样品名称	VA (万 IU/kg)	平均值 (万 IU/kg)	理论值(%)	占理论值 (%)	相对偏差 (%)	变异系数 (%)
1%蛋鸡添加剂预 混合饲料	99.00	105.97	105.00	100.72	0.72	3.72
	103.87					
	108.90					
	106.48					
	109.01					
	108.58					
10%种猪添加剂 预混合饲料	6.68	7.08	7.00	101.14	1.14	7.78
	7.89					
	7.43					
	6.45					
	6.72					
	7.31					

10 同一分析者对同一试样同时两次平行测定结果相对偏差的确定

对同一样品做两次平行测定，31 批次样品，有 30 批次样品相对偏差不大于 10%，测定结果见表 18。

表 18 同一样品两次平行测定结果相对偏差

序号	样品名称	标示量(万 IU/kg)	测定值 (万 IU/kg)		占标示量 (%)	相对偏差(%)
1	BS 维生素预混合饲料	4000	3721	3818	95.4	2.5
			3915			
2	BS 维生素预混合饲料	4000	4289	4336	108.4	1.1
			4383			
3	BS 维生素预混合饲料	2675	2712	2751	102.8	1.4
			2789			
4	ZY 维生素预混合饲料	4000	4383	4278	107.0	2.4
			4174			
5	ZY 维生素预混合饲料	4000	3938	4212	105.3	6.5
			4487			
6	JDW 维生素预混合饲料	4000	4298	4431	110.8	3.0
			4563			
7	JDW 维生素预混合饲料	4000	4590	4500	112.5	2.0
			4410			
8	XHC 维生素预混合饲料	4000	4331	4405	110.1	1.7
			4480			
9	XHC 维生素预混合饲料	4000	4365	4362	109.1	0.05
			4360			
10	A-多维 1 号(维生素预混合饲料)	≥4000	4310.19	4244.4	106.11	1.55
			4178.61			
11	A-多维 2 号(维生素预混合饲料)	≥3300	3864.38	3905.305	118.34	1.05
			3946.23			
12	A-多维 3 号(维生素预混合饲料)	≥1150	1178.85	1171.915	101.91	0.59
			1164.98			
13	X-多维 4 号(种猪多维 MY)	2400	2910.42	2862.525	119.27	1.67
			2814.63			
14	X-多维 5 号(母猪用维生素)	6500	6339.33	6557.735	100.9	3.33
			6776.14			
15	X-多维 6 号(生长猪多维 TB503)	1300	1451.96	1427.255	109.8	1.73
			1402.55			
16	J-多维 2 号(鸭用多维)	3600	3741.57	3513.285	97.58	6.49
			3285			
17	J-多维 3 号(仔猪用多维)	3600	3528.19	3580.415	99.44	1.46
			3632.64			
18	J-多维 4 号(肉猪多维 GDJF1375)	4550	4569.17	4594.975	100.97	0.56
			4620.78			
19	J-多维 7 号(反刍动物用多维)	4000	3665.62	3822.3	95.55	4.10
			3978.98			
20	DS-多维 3 号(鱼用维生素预混合饲料 2118)	700	738.50	702.315	100.33	5.15
			666.13			

表 18 同一样品两次平行测定结果相对偏差 (续)

序号	样品名称	标示量(万 IU/kg)	测定值 (万 IU/kg)		占标示量 (%)	相对偏差(%)
21	DS-多维 4 号 (禽用维生素预混合饲料 HCSSL)	1950	2010.32	1969.855	101.02	2.05
			1929.39			
22	猪用复合预混合饲料	16.9	17.0	16.3	96.4	4.3
			15.6			
23	种猪用复合预混合饲料	50	49.4	48.8	97.6	1.3
			48.1			
24	反刍用复合预混合饲料	7.0	6.39	6.67	95.3	4.2
			6.95			
25	DS-2 号 (1%水产复合预混合饲料 ZS802)	60	67.25	63.225	105.38	6.37
			59.20			
26	DS-3 号 (2%产蛋鸡产蛋期复合预混合饲料)	48.75	47.11	52.055	106.78	6.35
			57.00			
27	DS-4 号 (5%产蛋后备鸡育成期复合预混合饲料)	19.5	19.10	18.69	95.85	2.19
			18.28			
28	DS-复合预混料 5 号 (1%宠物复合预混合饲料 LQ D21)	170	171.29	154.71	91.00	10.72
			138.13			
29	仔猪复合预混合饲料 4%	20-35	29.16	30.125	符合	3.2
			31.09			
30	产蛋鸡复合预混合饲料 5%	14-20	19.29	19.92	符合	3.2
			20.55			
31	育成鸡复合预混合饲料 5%	15-20	17.76	18.985	符合	6.4
			20.21			

11. 直接提取方法与皂化方法检测结果对比

用直接提取法和皂化法分别测定了 9 组样品, 对 9 组配对数据, 通过配对 t 检验, 从统计学上了解直接提取法和皂化法测定的结果是否存在显著性差异。配对 t 检验结果显示, P 值为 0.39, 大于 0.05, 说明两种方法之间不存在显著性差异。检测结果见表 19。

表 19 复合预混合饲料直接提取方法与皂化方法检测结果对比

样品编号	样品名	直提 (IU/kg)	皂化 (IU/kg)	配对 t 检验 P 值
B210252	4315 大猪用复合预混合饲料	68100	54500	0.39
B210253	4% 生长育肥猪复合预混合饲料 (25-60kg) 113 赛源宝	182000	158000	
B210280	2% 产蛋期复合预混料	327000	318000	
B210285	5% 蛋小鸡复合预混合饲料	136000	132000	
B210299	0.2% 奶牛育成期复合预混合饲料牧场用 302	5490000	4320000	
B210300	0.2% 奶牛泌乳期复合预混合饲料 饲料自用 902	3420000	4180000	
B210314	仔猪后期复合预混合饲料 S5741	204000	196000	
B210315	产蛋鸡复合预混合饲料 S3836	164000	193000	
B210322	5% 肉羊复合预混合饲料-SH512	150000	181000	

(四) 小结

本文件样品前处理补充固相萃取方法、在线萃取方法，第一法给出了三个色谱条件，对于用液液萃取法的，可选用色谱参考条件一，该色谱参考条件与现行标准色谱条件一致。

考虑到用离线的固相萃取提取液，除测定维生素A外，还可用于维生素D₃的测定。在新修订的维生素D₃的国标中，会出现离线固相萃取法的相关内容，为了使该标准与新修订的维生素D₃国标相衔接，增加了色谱参考条件二，该色谱参考条件与修订的维生素D₃国标中一维色谱条件一致。

在线固相萃取法的样品前处理最简单，只需做样品皂化这一步，其余的都由仪器完成，具有操作简便，仪器自动化程度高的特点。对于碱性溶液的洗脱，目标分析物转移至分析色谱柱，均是通过在线固相萃取系统完成的，在分析方法的开发上，在线固相萃取系统的条件需与色谱分离系统的条件相匹配，因此

增加了色谱参考条件三。同时，该色谱参考条件与修订的维生素D₃国标中对应的一维色谱条件一致。

在不同添加水平下，固相萃取方法回收率范围为85.80%~119.00%，同一批次样品重复六次检测结果，标准偏差不大于1.71%，比较液液萃取和固相萃取两种方法检测结果，配对t检验结果显示，P值为0.17，大于0.05，说明两种方法之间不存在显著性差异。

在线固相萃取与原标准方法测定结果比较，配对t检验结果显示，P值为0.08，大于0.05，说明两种方法之间不存在显著性差异，同一批次样品重复10次检测结果，标准偏差不大于0.69%，变异系数为3.37%，重复性好，表明方法可行。

第二法适用范围补充了复合预混合饲料，通过方法学验证，方法准确度与精密度满足检测要求，与皂化方法比较，样品前处理操作步骤简单，检测结果配对t检验P值为0.39，大于0.05，有较好的重复性。

标准修订后，固相萃取方法、在线固相萃取方法简化了样品前处理步骤，减少了有机溶剂使用量，避免有机溶剂对实验人员危害的同时降低了实验成本，通过方法学考察，复合预混合饲料用直提方法检测完全满足目标物的测定要求，方法的改进，缩短了检测时间，提高了实验室工作效率。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

国际标准、AOAC方法中，采用氢氧化钾乙醇溶液皂化，石油醚提取，净化、浓缩后，处理好的样品溶液，采用高效液相色谱方法检测，与本文件第一法液液萃取方法相同，与固相萃取、在线固相萃取方法样品皂化方法相同。

五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准

合规引用。

六、与有关法律、法规的关系

本文件的制定遵循现行法律、行政法规的规定，配套标准包括“GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法”、“GB/T 20195 动物饲料 试样的制备”。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

无重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

九、贯彻标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议

建议按照推荐性国家标准管理办法设置自发布日期至实施日期的过渡期，并在过渡期间，评估是否需要购进或改进技术装备、检测手段等，以配合产品的相关检测。

十、其他应当说明的事项

无。

参考文献:

1. 饲料添加剂 维生素 A 乙酸酯微粒 GB/T 7292-1999
2. Animal feeding stuffs — determination of vitamin A content — Method using high-performance liquid chromatography ISO14565-2000
3. 液相色谱-串联质谱法检测饲料原料中维生素 A、维生素 D₃、维生素 E 分析与检测 2018 第 10 期